

Roberta de Paula Martins

**EFEITO DO DIFENIL DISSELENETO SOBRE O
DÉFICIT ENERGÉTICO E ALTERAÇÕES NA
MORFOLOGIA E CONTEÚDO MITOCONDRIAIS
INDUZIDOS PELO METILMERCÚRIO NO CÓRTEX
CEREBRAL DE CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Bioquímica do
Centro de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Santa
Catarina, como requisito parcial para a
obtenção do Título de Mestre em
Bioquímica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alexandra
Susana Latini

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Lucia
De Paul

Florianópolis

2012

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

M386e Martins, Roberta de Paula

Efeito do difenil disseleneto sobre o déficit energético e alterações na morfologia e conteúdo mitocondriais induzidos pelo metilmercúrio no córtex cerebral de camundongos [dissertação] / Roberta de Paula Martins ; orientadora, Alexandra Susana Latini. - Florianópolis, SC, 2012. 96 p.: il., grafs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Metilmercúrio. 3. Plaquetas (Sangue). 4. Mitocôndria - Respiração. I. Latini, Alexandra Susana. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

CDU 577

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por ter me concedido a oportunidade de aqui estar.

Aos meus pais, Roberto e Fátima, pelo amor, exemplo, confiança e incentivo que sempre me ofereceram.

Ao meu irmão, Leonardo, em quem eu sempre me espelhei, à minha cunhada, Sonia, pelo carinho. E ao meu sobrinho, Eduardo, que mesmo sem saber, torna mais feliz muitos momentos na minha vida, como este.

À minha orientadora, Prof. Alexandra Latini, principalmente por me fazer acreditar em mim mesma, pela sua confiança no meu trabalho, por seu exemplo e dedicação.

À minha co-orientadora, Ana Lucia De Paul, pelo auxílio prestado.

Aos professores da Pós-Graduação em Bioquímica, pelos conhecimentos repassados, em especial ao prof. Marcelo Farina, meu primeiro orientador na iniciação científica, por toda a ajuda durante a minha vida acadêmica.

Aos professores e amigos de Córdoba, que me orientaram e auxiliaram durante o período que lá estive.

Ao Prof. Rui Prediger e o Laboratório de Doenças Neurodegenerativas do Departamento de Farmacologia da UFSC.

Aos técnicos Bibiana e Dênis pela ajuda indispensável.

Aos secretários do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Roberto e Ronaldo, pela ajuda e paciência.

Aos inesquecíveis amigos do laboratório, Aderbal, Alessandra, Aline, Ana Júlia, Andreza, Anita, Bianca, Débora, Filipe, Flávio, Fritz, Gianni, Guilhian, Jade, Lucila, Karina, Marcos, Paulo, Priscila e Raíssa, pela colaboração e por tornarem essa jornada muito mais divertida. E especialmente a Vivi, que além de grande amiga, foi uma colaboradora essencial a este trabalho.

Às minhas amigas do coração, Tamirys, Marcela, Rafa, Tchéli, Camila, Flávia e Samara.

A todos os amigos e familiares, que me incentivaram, e que direta ou indiretamente participaram nesta fase da minha vida... Muito obrigada!!

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

“Queira! Basta ser sincero e desejar profundo...”

Raul Seixas

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS DISSERTAÇÃO

Figura 1	Ciclo do Mercúrio na natureza	17
Figura 2	Estruturas químicas da cisteína, metionina e do complexo cisteína – metilmercúrio (MeHg)	18
Figura 3	Anatomia bioquímica da mitocôndria	24
Figura 4	Proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa ...	26

LISTA DE FIGURAS DO MANUSCRITO

Figure 1	Behavioral tests and motor profile from adult mice exposed to methylmercury (MeHg; 20 mg/L and 40mg/L): (A) location index in object location task (% of controls); (B) average speed (m/s) and (C) distance travelled at open-field test (m); (D) falling latency in Rota-rod apparatus (seconds).....	70
Figure 2	Correlation studies between brain complex I (B), II (C) and II-III (D) activities or cognitive impairment (A) and platelet basal respiration.....	71
Figura 3	Brain energetics parameters in brain and platelets from adult mice exposed to methylmercury (MeHg; 20 mg/L and 40mg/L): (A) NADH dehydrogenase, complex II and complex II-III activities in MeHg-poisoned mouse cortical homogenates; (B) platelet basal respiration, (C) state IV respiration (under oligomycin effect), (D) maximal respiration (after FCCP addition) and (E) mitochondrial control ratio (between FCCP-titrated maximal respiration vs. state 4 respiration) in platelets.....	72
Figura 4	<i>In vitro</i> effect of methylmercury (MeHg) on mouse brain energetics parameters. (A) NADH dehydrogenase activity in cortical homogenates exposed to MeHg (0-1500µM) for 15 or 60 minutes; (B) MTT reduction and (D) mitochondrial H ₂ O ₂ generation and (C) lactate release from mouse cortical slices exposed to MeHg (0-1500µM) for 60	

	minutes.....	73
Figure 5 A-D	Mitochondrial ultrastructure in cerebral cortex from adult mice control (A); treated with diphenyl diselenide (PhSe) ₂ (B); exposed to methylmercury (MeHg; 40mg/L) (C) and exposed to methylmercury (MeHg; 40mg/L) plus diphenyl diselenide (PhSe) ₂ (D).....	74
Figure 5 E-H	Figures (E) and (F) are enlarged photos from control and MeHg group, respectively; (G) Cortical mitochondrial content; (H) Adenylate kinase, pyruvate kinase and creatine kinase activities.....	75

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	Desenho Experimental. Camundongos Swiss adultos machos foram expostos por três semanas a metilmercúrio (MeHg).....	36
Esquema 2	Desenho Experimental. Camundongos Swiss adultos machos foram expostos por três semanas a metilmercúrio (MeHg) e/ ou (PhSe) ₂ (5 µmol/kg)...	37

LISTA DE ABREVIATURAS

$\Delta\Psi_m$: Potencial de membrana mitocondrial
(PhSe)₂: Difenil Disseleneto
ADP: Adenosina-5'- difosfato
AK: Adenilato cinase
AMP: Adenosina-5'- monofosfato
ANT: Translocador de nucleotídeos de adenina
ATP: Adenosina-5'- trifosfato
BHE: Barreira hemato-encefálica
CK: Creatina cinase
citCK: Creatina cinase isoforma citosólica
DMSA = Ácido Meso-2,3-dimercaptosuccínico
DMPS = 2,3-Dimercapto-1-propanosulfonato
DNA: Ácido desoxirribonucleico
ERNs: Espécies reativas de nitrogênio
EROs: Espécies reativa de oxigênio
ETC: Cadeia de transporte de elétrons
FADH₂: Flavina adenina dinucleotídeo reduzida
FCCP: Carbonil cianeto p-trifluorometoxifenil hidrazona
GPx: Glutathione peroxidase
GR: Glutathione redutase
GSH: Glutathione reduzida
LAT1: Transportador de aminoácidos neutros 1
MeHg: Metilmercúrio
Mn-SOD: Manganês superóxido dismutase
mtCK: Creatina cinase isoforma mitocondrial
mtDNA: DNA mitocondrial
MTT: Brometo de 3-(4,5)-dimetil-tiazolil-2,5 difeniltetrazólio
NAC: *N*-Acetilcisteína
NADH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
PCr: Fosfocreatina
PD: Doença de Parkinson
PK: Piruvato cinase
Se: Selênio
smtCK: Creatina cinase isoforma mitocondrial sarcomérica
SNC: Sistema Nervoso Central
TFAM: Fator de transcrição para a biogênese mitocondrial
Trx: Tioredoxina
TrxR: Tioredoxina redutase
umtCK: Creatina cinase isoforma mitocondrial ubíqua

RESUMO

A exposição ao metilmercúrio (MeHg) causa danos neurológicos severos em animais e humanos, no entanto, a fisiopatogenia de tais alterações ainda não está completamente elucidada. Desta forma, investigou-se o efeito da exposição oral ao MeHg em roedores sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos, incluindo a fisiologia e morfologia mitocondrial. A exposição repetida (21 dias) ao MeHg (20 e 40mg/L) provocou um comprometimento da memória a curto prazo do tipo discriminativa, fato que foi evidenciado pela habilidade reduzida dos animais em reconhecer um novo objeto no seu ambiente familiar. Este prejuízo cognitivo correlacionou-se com deficiências bioenergéticas no sistema nervoso central (córtex cerebral) e na periferia (plaquetas), as quais foram manifestadas com redução nas atividades da NADH desidrogenase e complexos II e II-III, bem como da creatina cinase mitocondrial (mtCK), no córtex cerebral, e com um aumento no consumo de oxigênio em plaquetas de sangue periférico. Por outro lado, a análise de microscopia eletrônica mostrou uma redução na quantidade de mitocôndrias no córtex cerebral de animais intoxicados. Ainda, foi observado um predomínio de organelas tubulares, sugerindo que a morfologia mitocondrial estaria sendo controlada pelo processo de fusão. Para melhor entender o efeito tóxico do MeHg sobre a função mitocondrial, preparações de córtex cerebral de camundongos foram expostas ao mercurial (0-1500 μ M). Este tratamento provocou aumento na produção de H_2O_2 , inibição da redução do MTT e da atividade da NADH desidrogenase, e aumento na formação de lactato, sugerindo que a produção energética cerebral estaria comprometida na presença de MeHg. Considerando que estes tratamentos, *in vivo* e *in vitro* com MeHg, induziram disfunção mitocondrial e estresse oxidativo (inibição da enzima mtCK), procurou-se investigar os efeitos da coadministração do composto neuroprotetor difenil disseleneto – $(PhSe)_2$ – (administração subcutânea; 5 μ mol/kg) em animais intoxicados com MeHg. O tratamento com $(PhSe)_2$ preveniu as alterações ultraestruturais e o efeito inibitório do mercurial sobre a atividade da mtCK em camundongos expostos ao MeHg. Assim, estes dados em conjunto, indicam que a intoxicação por MeHg compromete a viabilidade celular provavelmente por induzir estresse oxidativo mitocondrial, que posteriormente estimularia o processo de fusão mitocondrial a fim de conservar o *status* energético cerebral. Adicionalmente, a partir deste

trabalho, pode-se propor que, por um lado, o comprometimento do consumo de oxigênio em plaquetas é um marcador sensível e não invasivo do prejuízo energético cerebral induzido pela intoxicação por MeHg, e por outro, que o uso de (PhSe)₂ poderia prevenir os efeitos tóxicos deste mercurial orgânico.

Palavras-chave: metilmercúrio, respiração mitocondrial plaquetária, disfunção mitocondrial, difenil disseleneto.

ABSTRACT

Considering that methylmercury (MeHg) exposure causes severe neurological damage in animals and humans, we have investigated the effects of MeHg poisoning on mitochondrial physiology in the brain and peripheral platelets of poisoned mice. Adult male mice exposed to MeHg (20 or 40mg/L) for twenty-one days showed a reduced ability for short-term object recognition. This MeHg-induced altered behavior, indicating discriminative short-memory impairment, was correlated with reduced NADH dehydrogenase, complex II and II-III activities in the cerebral cortex and with impaired systemic platelet oxygen consumption of intoxicated mice. Moreover, electron microscopy analysis showed enlarged and fused mitochondria leading to a reduced number of organelles in the MeHg-exposed cerebral cortex. Furthermore, cortical creatine kinase (CK) activity, a sensitive oxidative stress sensor, was almost abolished by the treatment. Next, MeHg-induced energetic impairment was studied in detail by evaluating the *in vitro* effect of MeHg exposure (0-1500 μ M), in brain preparations. MeHg-exposed cortical slices evidenced the increase of hydrogen peroxide production, inhibition in MTT reduction and increased lactate formation. In addition, marked reduction of NADH dehydrogenase activity in cortical homogenates exposed to MeHg, during 15 or 60 minutes, was observed. Since the *in vivo* and *in vitro* MeHg-treatments induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress, the effect from co-administration of diphenyl diselenide - (PhSe)₂ - (subcutaneous administration; 5 μ mol/kg) was also investigated in MeHg-poisoned mice. (PhSe)₂ treatment prevented from ultrastructural changes, mitochondrial content and the inhibitory effect on CK activity on MeHg-exposed mice. Therefore, these data strongly indicate MeHg poisoning probably compromises cell viability, by inducing mitochondrial oxidative stress, which could induce, in turn, to a mitochondrial fusion in order to conserve brain energy status. Additionally, we have also demonstrated that impaired systemic platelet oxygen consumption is a sensitive and non-invasive marker of the brain energy deficits induced by MeHg poisoning, and brain mitochondrial parameters could be prevented by (PhSe)₂ co-administration.

Keywords: methylmercury, platelet mitochondrial respiration, mitochondrial dysfunction, diphenyl diselenide

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. METILMERCÚRIO.....	16
1.1.1. Ciclo do mercúrio.....	16
1.1.2. Distribuição do metilmercúrio e efeitos da exposição ao mercurial em animais e humanos.....	17
1.1.3. Mecanismos moleculares envolvidos na neurotoxicidade induzida por MeHg em animais e humanos.....	20
1.1.4. Compostos neuroprotetores contra a toxicidade induzida pelo MeHg.....	21
1.2. ALVOS CELULARES POTENCIALMENTE MODULADOS PELO MeHg.....	23
1.2.1. Mitocôndria.....	23
1.2.1.1. Cadeia respiratória e fosforilação oxidativa.....	24
1.2.1.2. Dinâmica da morfologia mitocondrial.....	28
1.2.2. Creatina cinase (CK)	29
1.3. MECANISMOS DE DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL ASSOCIADOS À NEURODEGENERAÇÃO.....	30
2. HIPÓTESE.....	33
3. OBJETIVOS.....	34
3.1. OBJETIVO GERAL.....	34
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
4. MATERIAL, DESENHO EXPERIMENTAL E MÉTODOS.....	35
4.1. REAGENTES.....	35
4.2. EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	35
4.2.1. Animais.....	35
4.2.2. Protocolos Experimentais.....	35
4.2.2.1. Protocolo I.....	35
4.2.2.2. Protocolo II.....	36
4.2.3. Preparação das amostras para análise de parâmetros bioquímicos.....	36
4.2.3.1. Preparação de amostras para determinação da atividade dos complexos da cadeia respiratória e piruvato quinase (PK)....	36
4.2.3.2. Preparação de amostras para determinação da atividade da creatina cinase mitocondrial (mtCK) e adenilato cinase (AK)	37
4.2.3.3. Preparação de plaquetas para respirometria de alta resolução.....	37
4.3. EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>	38
4.3.1. Preparação das amostras.....	38

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
5. RESULTADOS.....	40
6. DISCUSSÃO.....	76
7. SUMÁRIO DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES.....	82
8. CONCLUSÃO GERAL.....	83
9. PERSPECTIVAS.....	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

1 INTRODUÇÃO

1.1 METILMERCÚRIO

O metilmercúrio (MeHg; CH_3Hg^+) é um poluente ambiental encontrado primariamente no ambiente aquático, devido a metilação do mercúrio por microrganismos (Ullrich, 2001). O mercúrio (Hg) presente no meio ambiente advém de fontes naturais, como emissão oceânica, depósitos minerais, vulcões e degradação da crosta, e antropogênicas, como fabricação de cloro e soda, fabricação de aparelhos elétricos, lâmpadas a vapor, fungicidas, inseticidas, mineração de ouro e queimada de florestas (Clarkson et al., 2003, Olivares, 2003, Pinheiro, 2009).

1.1.1. Ciclo do mercúrio

O ciclo global do Hg inicia-se com a sua evaporação para a atmosfera. O vapor de Hg é um gás monoatômico quimicamente estável e seu tempo de permanência na atmosfera é estimado em aproximadamente um ano. Assim, o vapor de Hg liberado numa determinada região é distribuído globalmente (Clarkson, 2002). Na atmosfera, o vapor de Hg pode sofrer oxidação ao íon divalente Hg^{+2} , através de contato com elementos atmosféricos como oxigênio, ozônio e cloro. Quando ionizado, o Hg torna-se mais solúvel e sujeito a deslocar-se da atmosfera, retornando aos meios terrestre e aquático por precipitação, sendo esta a maior fonte de mercúrio depositado no meio ambiente (Figura 1) (ATSDR, 1999, Clarkson et al., 2003, Vecchio, 2005, Clarkson and Magos, 2006).

No ambiente aquático, o Hg pode ser convertido em MeHg por bactérias anaeróbias redutoras de sulfato. Como molécula orgânica, o MeHg pode penetrar rapidamente na bicamada lipídica, por isso apresenta enorme potencial de biomagnificação: de concentrações aquáticas de 1 ng/L a mais de 1 mg/kg em peixes piscívoros (Nielsen and Andersen, 1992, Hintelmann, 2010). Assim, a principal via dietética de exposição humana ao MeHg é por ingestão de frutos do mar contaminados para adultos e via leite materno para crianças (Nielsen and Andersen, 1992, Clarkson, 1997).

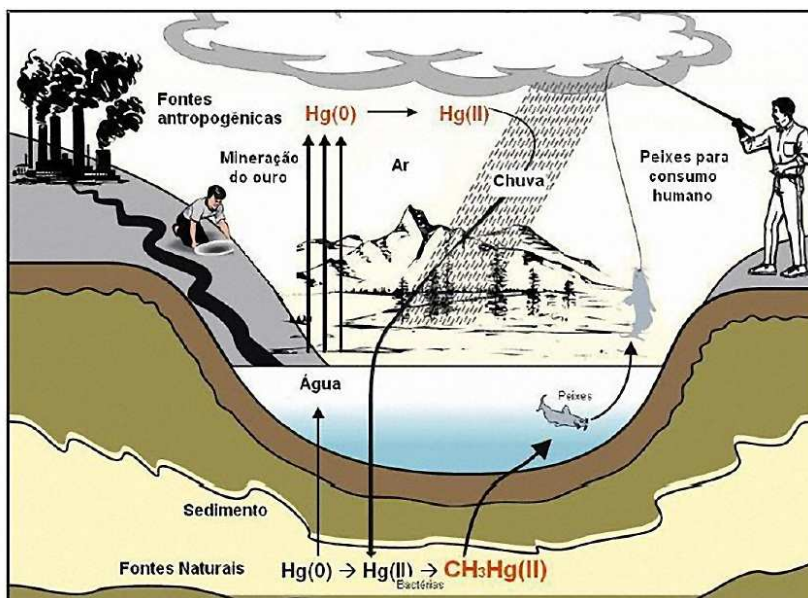


Figura 1: Ciclo do Mercúrio na natureza (adaptado de Clarkson et al., 2003).

No Brasil, a Portaria 685, de 1998, do Ministério da Saúde, fixou as “concentrações máximas de contaminantes químicos em alimentos” registrando, para o Hg, os valores de 0,5 mg/Kg para peixes e produtos da pesca (exceto predadores) e 1,0 mg/kg para peixes predadores (Brasil, 1998).

1.1.2. Distribuição do metilmercúrio e efeitos da exposição ao mercurial em animais e humanos

O MeHg proveniente da dieta é absorvido pelo trato gastrointestinal (aproximadamente 90%), o que contribui para sua alta disponibilidade e, conseqüentemente, toxicidade, difundindo-se rapidamente pela corrente sanguínea (Nielsen and Andersen, 1992, Clarkson, 1997).

Os cátions CH_3Hg^+ (MeHg) e Hg^{+2} possuem alta afinidade química por grupos tióis (R-S-) e sofrem rápida troca de um grupo tiól para outro, tanto intra quanto intermolecularmente. Na circulação, o mercurial liga-se a resíduos de cisteína livres, incluindo a glutatona reduzida (GSH), ou proteínas plasmáticas (principalmente albumina,

devido a sua alta concentração) ou eritrocitárias (principalmente hemoglobina) (Clarkson, 1993). Caso interaja com a cisteína, o MeHg pode ser transportado a diferentes tecidos por mimetismo molecular com o aminoácido metionina (Figura 2) (Clarkson, 1993, Farina, 2011a), através do transportador de aminoácidos neutros LAT1 (Clarkson, 1993, Yin et al., 2008).

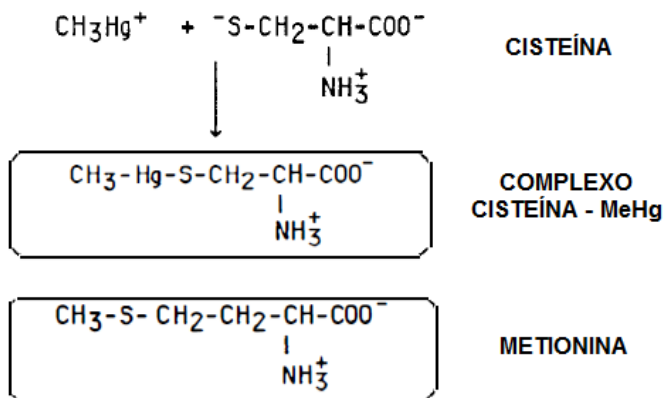


Figura 2: Estruturas químicas da cisteína, complexo cisteína – metilmercúrio e da metionina (Adaptado de Clarkson, 1993).

Após sua absorção, o MeHg é distribuído entre vários órgãos, sendo que mais de 10% do MeHg é retido no cérebro, o que faz do sistema nervoso central (SNC) o alvo mais sensível a seus efeitos (Skerfving, 1974), e um dos principais alvos de estudo sobre a intoxicação por MeHg (Clarkson, 2002). Além disso, o MeHg atravessa a placenta, acumulando-se preferencialmente no cérebro fetal em concentrações maiores que aquelas encontradas no sangue materno (Inouye et al., 1986, Cernichiari et al., 2007). Consequentemente, seus efeitos deletérios, tanto comportamentais como no desenvolvimento fetal, são observados logo após o nascimento, principalmente quando a exposição ocorre durante os estágios iniciais do desenvolvimento cerebral, mesmo se a gestante não apresentar sinais de intoxicação (Marsh et al., 1995, Myers and Davidson, 2000, Castoldi et al., 2001, Costa, 2004, Burger et al., 2006, Johansson et al., 2007, Grandjean and Herz, 2011). Estudos experimentais demonstram que tanto o Hg quanto o MeHg podem ser excretados no leite materno, tornando-se esta uma

forma de contaminação na fase lactacional (Manfroi et al., 2004, Franco et al., 2006).

Após exposição ao MeHg, várias regiões cerebrais exibem alterações patológicas. Estas alterações são caracterizadas por massiva neurodegeneração associada a desorganização da arquitetura celular do córtex cerebral e a severa atrofia das folias cerebelares (Hunter and Russell, 1954, Choi, 1989, Leyshon-Sorland et al., 1994, Eto et al., 1999). Desta forma, a exposição ao MeHg causa danos neuropatológicos severos e irreversíveis tanto em animais quanto em humanos (Choi, 1989, Gilbert and Grant-Webster, 1995, Rice and Barone, 2000, Clarkson et al., 2003). Os principais conhecimentos sobre a toxicidade do MeHg foram obtidos após episódios catastróficos de contaminação, como, por exemplo, o ocorrido no Japão, na década de 1950, o qual ficou conhecido como “doença de Minamata” (Clarkson, 2002). A população local, essencialmente pesqueira, começou a apresentar sintomas neurológicos, além do nascimento de crianças com deformidades e problemas no desenvolvimento mental. Concluiu-se que a população estava exposta ao MeHg pelo consumo de peixes de águas severamente poluídas pelo despejo de efluentes das indústrias locais (WHO, 1976, Harada, 1995, Clarkson, 2002). No total, esse evento teve 41 casos fatais e 22 casos dos então chamados “fetos de Minamata”, de mães expostas cronicamente ao MeHg (Ferguson and Sapolsky, 2007).

Outro evento importante de intoxicação pelo MeHg ocorreu na zona rural do Iraque na década de 1970, quando aproximadamente 40.000 pessoas ficaram doentes e centenas morreram por alimentarem-se de pães feitos com grãos que haviam sido tratados com um fungicida a base de Hg orgânico (Bakir et al., 1973, Clarkson, 2002).

A exposição aguda ao MeHg induz desmielinização, disfunção autonômica, atraso na condução do nervo sensorial, migração neuronal anormal e divisão celular anormal no SNC (Myers and Davidson, 2000, Stein et al., 2002, Sanfeliu et al., 2003, Spurgeon, 2006). Os sintomas de toxicidade crônica incluem parestesia, neuropatia periférica, ataxia cerebelar, acatisia, espasticidade, perda de memória, demência, constrição da visão, disartria, deficiências auditivas e nas sensações de odor e paladar, tremores e depressão (Choi, 1989, Gilbert and Grant-Webster, 1995, Rice and Barone, 2000, Clarkson, 2002, Stein et al., 2002, Clarkson et al., 2003, Spurgeon, 2006). Neste contexto, estudos pós-morte relataram danos a várias áreas cerebrais após exposição ao MeHg, representadas principalmente por alterações patológicas

cerebrais e cerebelares (Hunter and Russell, 1954, Eto et al., 1999). Sabe-se que a toxicidade do MeHg exibe um período de latência após a exposição, de tal ordem que, quando os sinais e sintomas clínicos aparecem, geralmente é tarde demais para reverter os danos causados pelo metal (Clarkson, 1997).

Estudos experimentais com animais expostos ao MeHg mostram que comportamentos relacionados a funções visuais (método de sensibilidade ao contraste visual; Burbacher et al., 2005), cognitivas (teste da esQUIVA inibitória; Ferraro et al., 2009) e emocionais (comportamento depressivo avaliado no teste do nado forçado; Onishchenko et al., 2007) são afetados pela exposição ao MeHg. Além disso, alterações de movimento, consistindo principalmente de ataxia e perda de equilíbrio, foram extensivamente relatados em estudos experimentais usando animais expostos ao MeHg (Dietrich et al., 2005, Farina et al., 2005, Lucena et al., 2007). Estes são usados como um importante parâmetro comportamental para correlacionar danos celulares/histológicos e mudanças bioquímicas após exposição a MeHg (Franco et al., 2006, Carvalho et al., 2007, Carvalho et al., 2008).

1.1.3. Mecanismos moleculares envolvidos na neurotoxicidade induzida por MeHg em animais e humanos

Os principais eventos moleculares envolvidos na neurotoxicidade induzida pelo MeHg descritos até o presente são aumento nas concentrações de cálcio (Ca^{2+}) intracelular, na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nas concentrações de glutamato extracelular via inibição da captação deste neurotransmissor pelos astrócitos (Limke and Atchison, 2002, Aschner et al., 2007, Farina et al., 2011). Evidências sugerem que o MeHg deposita-se principalmente nos astrócitos no SNC (Garman et al., 1975, Aschner, 1996, Charleston et al., 1996), provocando inibição da captação de glutamato, cistina e cisteína, afetando de forma prejudicial o conteúdo intracelular de GSH e o estado redox destas células (Brookes and Kristt, 1989, Dave et al., 1994, Allen et al., 2001a, Allen et al., 2001b, Shanker et al., 2001, Shanker and Aschner, 2001, Shanker et al., 2003).

Os eventos envolvidos na neurotoxicidade do MeHg dependem em grande parte das suas propriedades eletrofílicas, que permitem sua interação com grupos nucleofílicos (principalmente tióis e selenóis) de biomoléculas de baixo e alto peso molecular (Farina et al., 2011). A

interação do MeHg com grupos nucleofílicos nas biomoléculas é responsável, pelo menos em parte, pela indução de estresse oxidativo, condição definida como um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e as defesas antioxidantes do tecido, favorecendo a primeira (Cadenas and Sies, 1985, Sies and Cadenas, 1985, Halliwell and Gutteridge, 1990). Além disso, o MeHg pode prejudicar a atividade de proteínas, como a glutatona peroxidase (GPx), tioredoxina (Trx) e tioredoxina redutase (TrxR), envolvidas no sistema antioxidante celular, contribuindo para o comprometimento do equilíbrio redox normal das células cerebrais (Nogueira and Rocha, de Freitas et al., 2009, Franco et al., 2009, Carvalho et al., 2010, Glaser et al., 2010a, Wagner et al., 2010a, Wagner et al., 2010b, Branco et al., 2011, de Freitas and Rocha, 2011, Farina, 2011b).

Aparentemente, todos estes mecanismos poderiam comprometer a função mitocondrial com eventual prejuízo no metabolismo energético. Recentemente, mostrou-se que o MeHg acumula-se preferencialmente nas mitocôndrias e que as mitocôndrias cerebrais seriam mais susceptíveis que as hepáticas ao dano oxidativo induzido pelo toxicante (Mori et al., 2007). O MeHg pode prejudicar o funcionamento mitocondrial, por interagir com proteínas específicas que contem grupos tióis, incluindo os complexos I, I-III e IV da cadeia respiratória e a creatina cinase mitocondrial (mtCK) (Glaser et al., 2010a, Glaser et al., 2010b). A inibição da atividade destes complexos podem contribuir para a redução do potencial transmembrana mitocondrial (Yin et al., 2007), liberação de citocromo *c* no citoplasma (Shenker et al., 2002), seguido por ativação de caspases (Belletti et al., 2002, Shenker et al., 2002), abertura do poro de permeabilidade transitória mitocondrial e consequentemente apoptose (Bragadin et al., 2002). Estes efeitos mitotóxicos do MeHg foram relacionados com decréscimos nas concentrações de adenosina-5'-trifosfato (ATP) indicando a ocorrência de prejuízo energético (Fonfria et al., 2005).

1.1.4. Compostos neuroprotetores contra a toxicidade induzida pelo MeHg

Até o presente, não são conhecidas terapias eficazes para minimizar os efeitos tóxicos do MeHg. O uso de quelantes de metais tem sido uma alternativa para os profissionais da saúde para o tratamento de condições crônicas (Rush et al., 2009). Neste sentido, o

tratamento clínico primário da exposição aguda a metais pesados é realizado pela administração de compostos nucleofílicos contendo grupos tiois, como ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) e o 2,3-dimercapto-1-propanosulfonato (DMPS) (Risher and Amler, 2005, Rush et al., 2009), que mobilizam e removem efetivamente moléculas de metais tóxicas enquanto mantêm concentrações homeostáticas de metais essenciais como zinco (Andersen, 2004). Entretanto, a estabilidade destes compostos em soluções aquosas é limitada, resultando em disponibilidade reduzida para o uso em humanos, e ainda com uma propensão para mobilizar outros minerais, principalmente cátions divalentes essenciais para os numerosos processos fisiológicos (Mann and Travers, 1991, Grandjean et al., 1997, Nogueira et al., 2003b, Risher and Amler, 2005).

Por outro lado, a *N*-Acetilcisteína (NAC), um antioxidante contendo um grupamento tiol, também tem sido utilizado para minimizar várias condições de estresse oxidativo induzidas pelo MeHg. Acredita-se que a ação antioxidante da NAC esteja vinculada com a sua capacidade de estimular a síntese de GSH (Moldeus et al., 1986) e de remover EROs (Aruoma et al., 1989). Alguns estudos indicam que NAC também tem atividade quelante sobre vários metais pesados (Banner et al., 1986), além de aumentar a excreção de MeHg em roedores (Ballatori et al., 1998, Aremu, 2008).

Nogueira e colaboradores (2004) sugerem que os compostos contendo selênio (Se) podem ser bons candidatos no tratamento de intoxicações com MeHg. A interação entre Hg e Se foi inicialmente reportada por Parizek e Ostadalova (1967) que demonstraram o efeito protetor de selenito de sódio (forma inorgânica de Se) contra a toxicidade de Hg. Posteriormente, Ganther e colaboradores (1972) observaram que este composto diminuía a mortalidade e a perda de peso induzida pelo mercurial.

O Se é um nutriente essencial necessário para a síntese e atividade de aproximadamente vinte e cinco enzimas, que modulam o estado redox e antioxidante das células (Saito et al., 1999, Bianco et al., 2002, Panee et al., 2007). Neste cenário, tem-se sugerido que o Se protege contra a toxicidade do Hg por regular a expressão e conteúdo proteico de enzimas antioxidantes. Além disso, a forma reduzida do Se apresenta uma constante de afinidade pelo Hg maior do que outros compostos que contenham grupamentos tiois (Clarkson, 1997, Yoneda and Suzuki, 1997). Assim, assume-se a ligação direta entre Se e MeHg

como um dos mecanismos responsáveis pelo efeito protetor do Se na intoxicação com Hg (WHO, 1976, WHO, 1990, Lee et al., 2004, Clarkson and Magos, 2006, Yang et al., 2007). Neste processo de desintoxicação, o Se forma um complexo com o Hg, o SeHg, que parece ser metabolicamente inerte (Skerfving, 1978, Raymond, 2004). Assim sendo, a síntese e a investigação de propriedades farmacológicas de compostos orgânicos de Se tem sido objetivo de vários estudos.

O difenil disseleneto - $(\text{PhSe})_2$ -, composto orgânico contendo selênio, tem atividade mimética da GPx (Wilson, 1989). Este efeito pode apresentar propriedades prejudiciais ou benéficas dependendo da dose e via de administração usada nos protocolos experimentais em roedores (Ghisleni et al., 2003, Nogueira, 2003, Nogueira et al., 2003a, Meotti, 2004, Burger et al., 2006, de Bem et al., 2007). O $(\text{PhSe})_2$ tem se mostrado eficaz em proteger tecidos como cerebelo e fígado de camundongos de alguns efeitos tóxicos induzidos pela exposição ao MeHg a longo prazo (de Freitas et al., 2009). A capacidade antioxidante deste composto já foi mostrada por alguns pesquisadores (Ghisleni et al., 2003, Burger et al., 2004, Posser et al., 2006, Luchese et al., 2007a, Luchese et al., 2007b, Posser et al., 2008, Stralioetto et al., 2010), enquanto outros mostraram efeitos anti-inflamatório e antinociceptivo (Nogueira et al., 2003a, Zasso et al., 2005), além de hepatoprotetor (Borges et al., 2005, Borges et al., 2006) e antiaterogênico (de Bem et al., 2008, de Bem et al., 2009, Hort et al., 2011).

1.2. ALVOS CELULARES POTENCIALMENTE MODULADOS PELO MeHg

1.2.1. Mitocôndria

A mitocôndria é a organela celular responsável pela maior produção líquida de energia. É delimitada por uma dupla membrana, uma externa, de origem eucariótica, e outra interna, caracterizada pela ausência de colesterol e presença de cardiolipina, um elemento típico das membranas bacterianas. A membrana interna é organizada em dobras características, denominadas cristas, as quais se sobressaem na matriz e acomodam os complexos da cadeia respiratória. Em células saudáveis, a membrana interna é impermeável a íons (Fulda, 2010), o que permite a cadeia de transporte de elétrons (ETC) formar ativamente um gradiente de prótons no espaço intermembranas. O potencial de

membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) resulta da diferença de potencial elétrico e químico gerada pelo gradiente eletroquímico através da membrana interna. Através da fosforilação oxidativa, a mitocôndria desempenha seu papel essencial de suprir a célula com energia metabólica na forma de ATP (Figura 3) (Jezek, 2005).

A maquinaria molecular para a transferência energética mitocondrial está constituída por enzimas presentes na matriz mitocondrial (ciclo de Krebs), e por proteínas organizadas de maneira a formar um agrupamento localizado na membrana mitocondrial interna (ETC). Os complexos proteicos envolvidos na transferência de energia e respiração celular são codificados pelo genoma nuclear e mitocondrial (Di Donato, 2000).

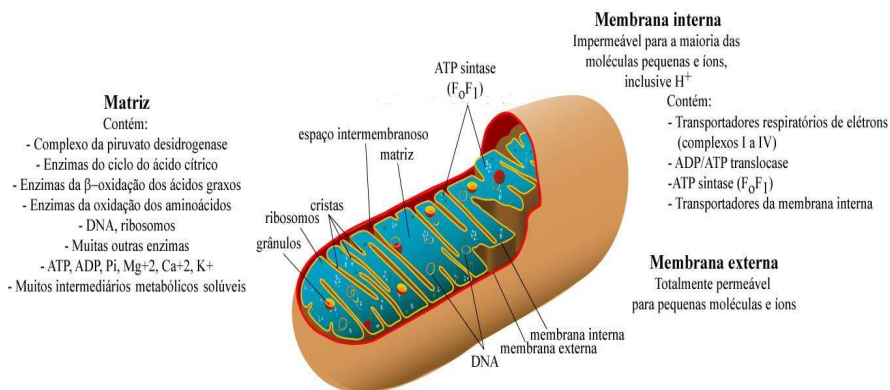


Figura 3. Anatomia bioquímica da mitocôndria (adaptado de Lehninger et al. (2004)).

1.2.1.1. Cadeia respiratória e fosforilação oxidativa

A fosforilação oxidativa, constituída pelo processo acoplado da transferência de elétrons pela ETC e pela fosforilação do difosfato de adenosina (ADP), é responsável pela síntese de quase a totalidade do ATP gerado nas células do SNC, e, também, em outros tecidos com grande necessidade de energia, como coração e músculo esquelético (Marks, 1996, Adhietty et al., 2003). A maior parte da energia

requerida pelo cérebro, e gerada pela mitocôndria, é usada para inverter o movimento de íons que provocam potenciais de ação e a transmissão sináptica em neurônios. A mitocôndria também sequestra e tampona o cálcio citoplasmático; assim, sua localização desempenha um papel na regulação local da dinâmica do cálcio intracelular (Bolanos and Almeida, 2010, MacAskill and Kittler, 2010).

A fosforilação oxidativa é também responsável pelo ATP produzido em células sanguíneas como as plaquetas, que são restos celulares derivados de megacariócitos de medula óssea e que contém de duas a oito mitocôndrias por elemento (Chernyak, 1965, Booyse et al., 1968). Alguns pesquisadores vêm propondo a avaliação da produção energética em plaquetas como um marcador sistêmico de alterações centrais, como por exemplo, na senescência e em doenças relacionadas à idade (Kunz et al., 1995, Pich, 1996, Xu et al., 2007).

A fosforilação oxidativa é um processo que requer a ação orquestrada dos cinco complexos enzimáticos organizados na ETC. Os elétrons oriundos da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e da flavina adenina dinucleotídeo (FADH₂), provenientes do ciclo de Krebs e de outras reações catalisadas por desidrogenases, são transferidos a ETC, e tem o oxigênio molecular comoceptor final. Este processo é acoplado à translocação de prótons através da membrana mitocondrial interna e a síntese endergônica de ATP, empregando como força motriz a energia armazenada como gradiente eletroquímico de prótons (Figura 4) (Di Donato, 2000).

A transferência de elétrons e o bombeamento de prótons, eventos ligados à respiração, são realizados pela ETC. Os complexos enzimáticos da ETC compreendem a maior parte das proteínas embebidas na membrana mitocondrial interna. Cada complexo é constituído de várias subunidades proteicas que se encontram associados com uma variedade de grupamentos prostéticos com potencial de oxirredução sucessivamente maiores (Voet, 1995).

Os elétrons que provêm principalmente da glicólise e do ciclo de Krebs são doados através do NADH e entram pelo complexo I (NADH – Coenzima Q redutase), o qual transfere estes elétrons para a coenzima Q (CoQ), também chamada de ubiquinona. Este complexo é o maior componente proteico presente na membrana mitocondrial interna e é formado por sete unidades codificadas pelo DNA mitocondrial e pelo menos por 34 subunidades codificadas pelo DNA nuclear (Voet, 1995; Di Donato, 2000). O Complexo I possui uma molécula de flavina

mononucleotídeo (FMN) como grupamento prostético e de seis a sete centros ferro-enxofre, os quais participam da transferência de elétrons. O NADH é capaz de transferir dois elétrons, e a FMN e CoQ são capazes de aceitar um ou dois elétrons de cada vez, pois suas formas semiquinonas são estáveis.

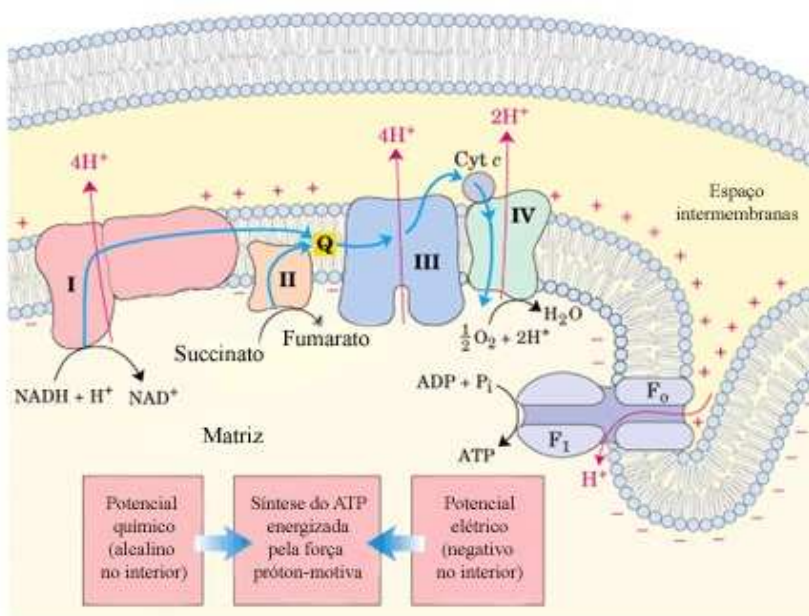


Figura 4. Proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa (adaptado de Lehninger et al. (2004)).

O complexo II (Succinato – Coenzima Q redutase) é composto por quatro subunidades proteicas, dentre elas a enzima dimérica succinato desidrogenase, componente do ciclo de Krebs, todas codificadas pelo DNA nuclear. Neste complexo, os elétrons providos do FADH₂ são doados para a CoQ. Estão presentes um FAD covalentemente ligado à succinato desidrogenase, dois centros ferro-enxofre e um citocromo *b560* (Voet, 1995; Di Donato, 2000).

Os elétrons providos da CoQ são transferidos para o carreador móvel de elétrons, o citocromo *c* através do Complexo III (Coenzima Q – Citocromo *c* redutase). Este complexo está arranjado assimetricamente

na membrana mitocondrial interna contendo 11 subunidades, onde três delas contém centros redox utilizados na geração de energia. Estas três unidades chaves estão representadas pelo citocromo *b*, único codificado pelo genoma mitocondrial, um centro ferro-enxofre e o citocromo *c1* (Saraste, 1990).

O Complexo IV (Citocromo *c* oxidase) é o último complexo da cadeia transportadora de elétrons, onde estes são transferidos do ferrocitocromo *c* para o oxigênio molecular. Este complexo consiste de doze ou mais subunidades polipeptídicas (Barrientos et al., 2002). O centro catalítico da enzima é formado por três subunidades maiores e são codificadas pelo DNA mitocondrial. A subunidade I contém grupamentos heme e um dos íons Cu (CuB), e a subunidade II contém um centro de Cu binuclear (CuA) (Capaldi, 1990). A subunidade III não apresenta grupamento prostético e não parece estar envolvida na síntese de ATP, apenas favorece a estabilidade estrutural. As demais subunidades, codificadas pelo DNA nuclear, não parecem ser essenciais ao mecanismo catalítico básico de redução de oxigênio e à transferência vetorial de prótons (Saraste, 1990; Barrientos et al., 2002). A reação redox entre o citocromo *c* e o oxigênio molecular é irreversível, sendo a citocromo *c* oxidase uma enzima chave na produção de energia (Poyton e McEwen, 1996).

O complexo V ou ATP sintase é responsável pela síntese de ATP, sendo formado por duas subunidades codificadas pelo DNA mitocondrial (ATPase 6 e 8) e pelo menos por doze subunidades codificadas pelo DNA nuclear. É formado por um componente catalítico solúvel localizado na matriz mitocondrial (F1-ATPase) e um componente de membrana hidrofóbico (Fo-ATPase) o qual contém um canal de prótons e é sensível ao antibiótico oligomicina (Saraste, 1990).

Os complexos transmembrana I, III e IV, além de participarem na ETC, têm a sua atividade vinculada à transferência de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, contribuindo para a formação do gradiente eletroquímico de prótons. Este gradiente determina a polarização da membrana mitocondrial interna ($\Delta\Psi_m$), que pode ser revertida pelo fluxo desses prótons através do componente F_0 da ATP sintase. O fluxo de prótons leva à condensação do ADP e de fosfato inorgânico em ATP (Saraste, 1990, Wallace, 1999). A ATPsintase é uma enzima funcionalmente reversível que pode catalisar tanto a síntese quanto a hidrólise de ATP (Saraste, 1990).

1.2.1.2. Dinâmica da morfologia mitocondrial

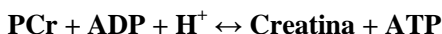
A mitocôndria é uma organela altamente dinâmica, essencial para a vida e morte das células por estar envolvida na apoptose e na manutenção da homeostase celular. A complexidade da estrutura mitocondrial foi destacada pela descoberta da organização de uma rede dinâmica de mitocôndrias dentro das células (Nunnari, 1997, Shaw, 2002).

Dependendo do tipo celular e das necessidades metabólicas da célula, a mitocôndria existe em diferentes formas e tamanhos. Dentro de uma única célula, a mitocôndria existe como duas formas interconvertíveis, túbulos longos e pequenas vesículas redondas, as quais estão balanceadas no equilíbrio dinâmico organizacional. Este equilíbrio existe devido ao fato de as mitocôndrias estarem continuamente sofrendo processos de fusão e fissão, e a relativa contribuição de cada processo determina o grau de continuidade da rede mitocondrial, bem como o tamanho médio das mitocôndrias dentro da célula. Os estímulos que induzem a mudança deste equilíbrio para morfologia altamente ramificada ou completamente fragmentada estão ligados às condições celulares, por exemplo, estresse celular, e compartimentalização celular, por exemplo, axônios e dendritos neuronais, bem como o estado funcional das mitocôndrias, entre outros (Benard and Karbowski, 2009). Por exemplo, a proteína Pink 1, promove fissão mitocondrial por interagir com a maquinaria de morfogênese mitocondrial. A fissão mitocondrial pode facilitar a localização das mitocôndrias nas sinapses e regular a força e integridade sináptica. Em paralelo, a fissão pode ser vista como uma “guerra” na qual as mitocôndrias se engajam em lutar contra o estresse e preservar o genoma e componentes mitocondriais, para promover a sobrevivência do neurônio. A perda de função de Pink1, uma das causas da doença de Parkinson, resulta em elevada fusão mitocondrial, aumentando o número de mitocôndrias grandes, com reduzida mobilidade, e, consequentemente, o transporte mitocondrial pode estar comprometido. O excesso de fusão leva a inchaço, fragmentação e provavelmente a disfunção mitocondrial. O suprimento local de ATP e o tamponamento de Ca^{2+} pode ser impactado de forma negativa e a transmissão dopaminérgica prejudicada (Yang and Lu, 2009).

1.2.2. Creatina cinase (CK)

Outro sistema cerebral para a manutenção do estado energético é o sistema catalisado pela enzima creatina cinase (CK). O cérebro de mamíferos contém uma reserva energética adicional na forma de sistema fosfocreatina / creatina. O conteúdo total de nucleotídeos de adenina (ATP + ADP + AMP) é de aproximadamente $3 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ de tecido. A concentração de ATP excede em 10 vezes a do ADP e em quase 100 vezes a de adenina monofosfato (AMP). Fosfocreatina / creatina totalizam $10 - 14 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ de tecido e estão presentes na proporção de 1:1 (Erecinska et al., 1994).

As CKs (ATP:creatina *N*-fosforibosiltransferase) são uma família de enzimas que catalisam a transferência reversível de um grupamento *N*-fosforibosil entre fosfocreatina (PCr) e ADP, conforme a seguinte reação (Bessman and Carpenter, 1985, Bittl and Ingwall, 1985):



As CKs são importantes mediadores da homeostase celular pois possuem papel fundamental na transferência de energia nas células que apresentam uma elevada taxa metabólica, fornecendo um sistema eficaz de tamponamento do ATP (Bessman and Carpenter, 1985, Adhietty and Beal, 2008, Andres et al., 2008). A velocidade de reação excede em magnitude a velocidade de síntese de ATP celular pela fosforilação oxidativa. Esse fenômeno pode explicar a habilidade dos tecidos cardíaco e muscular e dos neurônios em alternar a velocidade de consumo de energia durante os períodos de maior atividade (Bittl and Ingwall, 1985, Saks et al., 1996a, Saks et al., 1996b).

Existem diferentes isoformas de CK específicas para cada tipo de tecido, codificadas por genes diferentes. As isoenzimas citosólicas existem exclusivamente como moléculas diméricas, compostas por dois tipos de subunidades, originando três diferentes isoformas: CK-MM e CK-BB, como homodímeros, e o heterodímero CK-MB. A CK-MM é predominante no tecido muscular esquelético maduro e no miocárdio de mamíferos, a CK-BB está presente no cérebro e tecido nervoso periférico, e a CK-MB é encontrada somente no tecido cardíaco (Wallimann et al., 1992).

As isoenzimas citosólicas (citCK) e mitocondriais (mtCK) são coexpressas na maioria dos tecidos que possuem atividade de CK.

MtCK está presente principalmente em tecidos com alta demanda energética como no músculo esquelético, coração, cérebro, retina e espermatozóides. MtCK sarcomérica (smtCK) é quase exclusivamente expressa no coração e músculo esquelético, enquanto que a mtCK ubíqua (umtCK) é principalmente encontrada nos rins, placenta, intestino e cérebro. Dessa forma, parece que a smtCK acompanha a distribuição de CK-M, enquanto que umtCK a CK-B (Wyss et al., 1992). Tem sido demonstrado que as isoformas presentes no cérebro são o homodímero citosólico CK-BB e a isoenzima mitocondrial umtCK. Ainda, observou-se que a expressão de CK-BB é maior nos astrócitos e oligodendrócitos do que nos neurônios (Molloy et al., 1992).

As isoformas mitocondriais podem apresentar uma conformação dimérica ou octamérica, sendo esta última a estrutura funcional. As mtCKs estão localizadas no espaço intermembranas mitocondrial (Jacobs et al., 1964) onde os octâmeros ligam-se à membrana mitocondrial externa, interagindo funcionalmente com as proteínas que conformam o poro de transição mitocondrial, o translocador de nucleotídeos de adenina (ANT) na membrana mitocondrial interna e à porina da membrana mitocondrial externa (Eppenberger et al., 1967, Brooks and Suelter, 1987, Wyss et al., 1992, Schlattner et al., 1998). As mtCKs tem acesso preferencial ao ATP gerado a partir da fosforilação oxidativa que é exportado da matriz mitocondrial através do ANT (Saks et al., 1986, Vendelin et al., 2004). Regiões enriquecidas em mtCK, ANT e porinas são chamados de sítios de contato entre as membranas externa e interna da mitocôndria (Beutner et al., 1996, Beutner et al., 1998).

1.3. MECANISMOS DE DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL ASSOCIADOS À NEURODEGENERAÇÃO

O cérebro é um dos órgãos metabolicamente mais ativos, requerendo duas vezes mais energia que o coração em repouso. Este tecido representa 2% da massa corporal do homem adulto e consome em torno de 20% do total de O₂ disponível para o organismo (Dickinson, 1996). Tendo em vista que a fosforilação oxidativa é responsável pela quase totalidade do ATP produzido no SNC, a regulação da respiração mitocondrial torna-se essencial para o correto metabolismo energético cerebral (Erecinska et al., 1994). Desta forma, tem-se sugerido que esta organela é um alvo sensível na neurodegeneração induzida por

estímulos ou toxicantes agudos e crônicos, incluindo aqueles induzidos pelo MeHg (Fiskum et al., 1999, Lin and Beal, 2006). Ainda, aparentemente, o estresse oxidativo está relacionado à patogênese de várias doenças que afetam o SNC, como as doenças neurodegenerativas crônicas, epilepsia, esclerose múltipla, e demência (Reznick, 1993, Halliwell, 2006).

Como a mitocôndria é o sítio celular onde acontece a redução do oxigênio em água, esta organela representa o principal local de produção de EROs em condições fisiológicas (Chance et al., 1979, Sipos et al., 2003), especialmente ao nível dos complexos I e III da cadeia respiratória, onde elétrons derivados do NADH e ubiquinona podem reagir diretamente com oxigênio ou outros aceptores de elétrons e gerar espécies reativas (Muller, 2004, Jezek, 2005). Portanto, EROs são um produto normal da respiração celular, mas sua produção aumenta no caso de um bloqueio da ETC (Nicholls and Budd, 2000, Sipos et al., 2003).

Pode-se citar a produção de superóxido e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como os principais agentes causadores de estresse oxidativo na célula. Para contrabalancear a produção de espécies reativas, a mitocôndria possui sistemas de defesa antioxidantes, como as enzimas manganês superóxido dismutase (Mn-SOD), peroxiredoxinas, o sistema GPx/glutathione redutase (GR), a coenzima Q10 (ubiquinona), creatina e nicotinamida (Okado-Matsumoto and Fridovich, 2001, Droge, 2002, Fernandez-Checa, 2003, James et al., 2004, Kojo, 2004). Além disso, foi recentemente demonstrado que cinases mitocondriais, como a hexoquinase e a mtCK, possuem um papel essencial como antioxidantes mitocondriais (Dolder et al., 2003, Santiago et al., 2008). Este efeito parece estar relacionado com a capacidade de modular o $\Delta\Psi_m$; quanto maior o valor do $\Delta\Psi_m$, maior a probabilidade de formar EROs. Sabe-se ainda que a taxa de produção de EROs é inversamente proporcional à disponibilidade de ADP intramitocondrial (Korshunov et al., 1997, Cadenas and Davies, 2000). A produção excessiva de EROs pode também induzir a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados de membrana, muito concentrados no SNC, levando a múltiplos produtos tóxicos de peroxidação lipídica (Poli and Schaur, 2000).

EROs e espécies reativas do nitrogênio (ERNs) podem inibir vários complexos da cadeia respiratória, bem como oxidar e fragmentar o DNA mitocondrial (Radi et al., 2002), gerando um círculo vicioso entre o bloqueio da ETC e a produção de espécies reativas. Neste

sentido, foi também demonstrado que deficiências nas atividades dos complexos da cadeia respiratória são acompanhadas de depleção celular de GSH, principal antioxidante natural, e ainda que o grau de inibição da cadeia respiratória é proporcional à magnitude da depleção desse antioxidante (Barker et al., 1996, Bolanos et al., 1996). O déficit energético e o aumento da produção de espécies reativas podem levar secundariamente a uma diminuição na atividade da Na^+K^+ -ATPase com consequente despolarização da membrana plasmática, perda da homeostase celular, excitotoxicidade secundária e/ou ativação das cascatas de apoptose (Beal, 2005). Neste cenário, a produção de EROs, juntamente com a liberação de proteínas pró-apoptóticas para o espaço intermembranas, desencadeia a morte apoptótica, uma forma controlada de morte celular, a qual apresenta papel fundamental durante o desenvolvimento embrionário e na manutenção dos tecidos no adulto. Defeitos na regulação desta via estão associados com a patogênese de doenças neurodegenerativas (Li et al., 1997, Budihardjo et al., 1999, Allan and Clarke, 2009). Ainda, a abertura do poro de transição mitocondrial, passo essencial para induzir apoptose, parece estar regulada em parte pela atividade da umtCK (Andrienko et al., 2003, Vyssokikh and Brdiczka, 2003).

2 HIPÓTESE

Considerando que o MeHg é um poluente ambiental altamente neurotóxico, tanto para animais quanto para seres humanos, e que a disfunção mitocondrial é um processo envolvido na fisiopatologia de numerosas doenças neurológicas/degenerativas, hipotetizamos que o MeHg induz alterações na função mitocondrial que provavelmente são acompanhadas por mudanças na morfologia da organela, e que estas podem representar mecanismos chaves vinculados à neurotoxicidade induzida pelo mercurial. Além disso, acreditamos que as alterações moleculares no SNC tem reflexo em nível sistêmico, e que a determinação do funcionamento mitocondrial em plaquetas poderia ser utilizado como biomarcador para prognosticar as alterações induzidas pelo MeHg no SNC.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo investigar os efeitos da exposição prolongada por via oral ao MeHg sobre o metabolismo energético, função e ultraestrutura mitocondrial em cérebro e plasma rico em plaquetas de roedores, bem como, da administração do composto derivado de selênio, (PhSe)₂, em animais intoxicados com o mercurial, com o intuito de melhor entender os mecanismos que contribuem à neurotoxicidade induzida por este composto orgânico e a neuroproteção promovida pelo (PhSe)₂.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Investigar os efeitos da exposição oral e repetida de MeHg sobre parâmetros comportamentais em camundongos Swiss adultos;
- b) Investigar o efeito do MeHg sobre a respiração mitocondrial e conteúdo de mitocôndrias em sistemas experimentais *in vivo*, córtex cerebral e/ou sangue periférico de camundongos Swiss intoxicados com MeHg, e *in vitro*, fatias e homogenato de córtex cerebral de camundongos Swiss.
- c) Investigar o efeito da coadministração de (PhSe)₂ e de MeHg em camundongos Swiss, sobre os parâmetros bioquímicos acima mencionados.
- d) Avaliar se a respiração mitocondrial em plaquetas pode ser considerada um biomarcador sanguíneos que permite prognosticar as alterações no SNC induzidas pelo MeHg.

4. MATERIAIS, DESENHO EXPERIMENTAL E MÉTODOS

4.1. REAGENTES

Todos os reagentes utilizados foram de grau de pureza P.A. e adquiridos da empresa Sigma (St. Louis, MO, USA), exceto o cloreto de metilmercúrio (II), o qual foi obtido da Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI). O $(\text{PhSe})_2$ foi sintetizado e caracterizado por nosso grupo como descrito previamente (Paulmier, 1986). A pureza química do $(\text{PhSe})_2$ foi determinada por GC/HPLC (99.9% de pureza).

4.2. EXPERIMENTOS *IN VIVO*

4.2.1. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss albinos machos adultos obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram mantidos em biotério com ciclo claro-escuro de 12/12 horas, a 24 ± 1 °C, com acesso livre à água e comida (Nuvital, PR, Brasil). Cabe salientar que durante todos os procedimentos seguiram os princípios básicos do uso de animais em toxicologia (adotados pela Sociedade de Toxicologia em Julho de 1989), minimizando o número de animais bem como seu sofrimento. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (Protocolo CEUA N° PP00084 e PP00373).

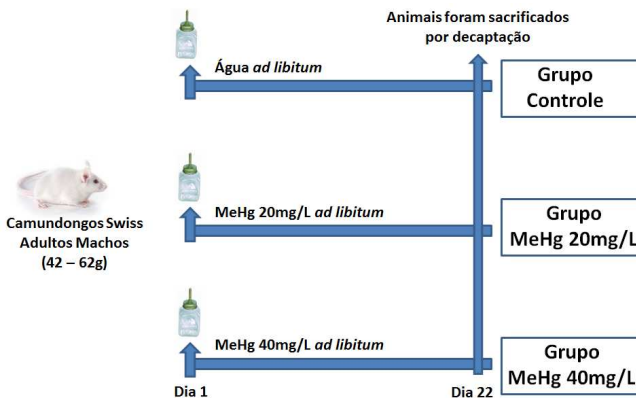
4.2.2. Protocolos experimentais

O MeHg foi administrado na concentração de 40 mg/L (diluído na água de beber) por 21 dias. Esta forma de administração do mercurial induz concentrações cerebrais de Hg de $3 - 5 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ de tecido ($3 - 5$ ppm) (Franco et al., 2006).

4.2.2.1. Protocolo I

Este protocolo experimental foi realizado com 30 animais divididos randomicamente em três grupos: grupo controle (veículo constituído por água); MeHg 20 mg/L (equivalentes a 20 ppm); MeHg

40 mg/L (equivalentes a 40 ppm) (Esquema 1). Os animais permaneceram nessas condições por 21 dias.



Esquema 1. Desenho Experimental. Camundongos Swiss adultos machos foram expostos por três semanas a metilmercúrio (MeHg). Para detalhes ver Materiais e Métodos.

4.2.2.2. Protocolo II

Este protocolo incluiu tratamentos adicionais de administração subcutânea de $(\text{PhSe})_2$ ($5 \mu\text{mol/kg}$). Assim, 24 animais foram divididos em quatro grupos experimentais: controle; MeHg 40 mg/L; $(\text{PhSe})_2$, e MeHg 40 mg/L + $(\text{PhSe})_2$. O MeHg foi diluído na água de beber, o $(\text{PhSe})_2$ foi dissolvido em dimetilsulfóxido (0,1%) e administrado por via subcutânea diariamente (Yamamoto, 1985) (Esquema 2). Os animais do grupo controle receberam injeções de veículo (1 mL/kg de peso corporal).

4.2.3. Preparação das amostras para análise de parâmetros bioquímicos

4.2.3.1 Preparação de amostras para determinação da atividade dos complexos da cadeia respiratória e piruvato cinase (PK)

Os animais foram sacrificados por decaptação e o córtex cerebral foi rapidamente dissecado e homogeneizado (1:20 p/v) em tampão fosfato, pH 7.4, contendo 5 mM de KH_2PO_4 , 0.3 M de sacarose, 5 mM

(Frankenberg, 1979), usando uma seringa de 1 mL e citrato de sódio como anticoagulante. As plaquetas foram preparadas por centrifugação a $500 \times g$ durante 15 minutos resultando em um plasma rico em plaquetas (adaptado de Sjoval et al., 2010).

4.3. EXPERIMENTOS *IN VITRO*

Os experimentos *in vitro* foram realizados com homogenatos e fatias corticais incubadas com concentrações crescentes de MeHg (0-1500 μM). Os homogenatos corticais foram incubados com MeHg durante 15 e 60 minutos a 37°C , e as fatias corticais foram expostas ao MeHg durante 60 minutos a 37°C em meio com tampão Krebs, pH 7.4 contendo 122 mM de NaCl, 3 mM de KCl, 1.2 mM de MgSO_4 , 0.4 mM de KH_2PO_4 , 1.3 mM de CaCl_2 , 25 mM de NaHCO_3 e 10 mM de glicose. O grupo controle não foi exposto a MeHg. O MeHg foi solubilizado em tampão fosfato 100 mM, pH 7.4. Por usar uma ampla faixa de concentrações de MeHg, determinou-se a concentração de MeHg necessária para reduzir em 50% (IC_{50}) a atividade da enzima NADH desidrogenase (complexo I) (Dixon, 1964, Latini et al., 2005a).

4.3.1 Preparação das amostras

Após a dissecação do córtex cerebral em gelo, utilizou-se parte do tecido para preparação dos homogenatos como descrito acima, e com a outra parte foram realizadas secções transversais na estrutura cerebral (fatias de 400 μm) usando o fatiador de tecido McIlwain Tissue Chopper. As fatias corticais foram transferidas para placas de cultura de 96 poços e pré-incubadas em 95% O_2 /5% CO_2 durante 30 minutos a 37°C em meio com tampão Krebs, pH 7.4, contendo 122 mM de NaCl, 3 mM de KCl, 1.2 mM de MgSO_4 , 0.4 mM de KH_2PO_4 , 1.3 mM de CaCl_2 , 25 mM de NaHCO_3 e 10 mM de glicose. Posteriormente, o meio dos poços foi trocado e as fatias corticais foram expostas ao MeHg.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram realizados em duplicata ou triplicata e a média foi usada para os cálculos. A significância estatística foi determinada pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguido de teste de Tukey, quando o valor de F foi significativo. Somente os

valores significantes de F são mostrados no texto. Para análises de efeitos dose-dependentes, utilizou-se regressão linear. Em alguns casos, os resultados dos animais tratados com MeHg 40 mg/L foram comparados aos controles, utilizando-se teste t de Student para amostras não-pareadas. A correlação de Pearson, r , foi analisada entre as atividades dos complexos da cadeia respiratória cerebral e o consumo de oxigênio das plaquetas periféricas, ou com o prejuízo cognitivo. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo. Todas as análises estatísticas foram feitas através do programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences). Todos os gráficos foram gerados usando GraphPad Prism 5®.

5 RESULTADOS

Os resultados emergentes do presente trabalho foram organizados no manuscrito com o seguinte título:

“Altered mitochondrial ultrastructure, diminished content and energetics in the cerebral cortex from methylmercury-poisoned mice are prevented by diphenyl diselenide administration”

Este trabalho foi submetido em 16 de janeiro de 2012 ao periódico científico *Neurotoxicity Research*.

Altered mitochondrial ultrastructure, diminished content and energetics in the cerebral cortex from methylmercury-poisoned mice are prevented by diphenyl diselenide administration

Roberta de Paula Martins^{1Ω}, Viviane Glaser^{1Ω}, Débora Scheffer¹, Clóvis Milton Duval Wannmacher², Rui Daniel S. Prediger³, Paulo Alexandre de Oliveira³, Ana Lucia De Paul⁴, Jorge Mukdsi⁴, Alicia Torres⁴, Andreza Fabro de Bem¹, João Batista Teixeira Rocha⁵, Marcelo Farina¹, Alexandra Latini^{1*}

¹*Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, Brazil*

²*Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, Brazil*

³*Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil*

⁴*Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina*

⁵*Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS, Brazil*

^ΩEqual contribution

*Corresponding author: Alexandra Latini

Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo

Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis / SC, Brazil.

Tel: + 55 48 37214743

Fax: + 55 48 3721 9672

E-mail: alatini@ccb.ufsc.br

Abstract

Considering that methylmercury (MeHg) exposure causes severe neurological damage in animals and humans, we have investigated the effects of MeHg poisoning on mitochondrial physiology in the brain and peripheral platelets of poisoned mice. Adult male mice exposed to MeHg (20 or 40mg/L) for twenty-one days showed a reduced ability for short-term object recognition. This MeHg-induced altered behavior, indicating discriminative short-memory impairment, was correlated with reduced NADH dehydrogenase, complex II and II-III activities in the cerebral cortex and with impaired systemic platelet oxygen consumption of intoxicated mice. Moreover, electron microscopy analysis showed enlarged and fused mitochondria leading to a reduced number of organelles in the MeHg-exposed cerebral cortex. Furthermore, cortical creatine kinase (CK) activity, a sensitive oxidative stress sensor, was almost abolished by the treatment. Next, MeHg-induced energetic impairment was studied in detail by evaluating the *in vitro* effect of MeHg exposure (0-1500 μ M), in brain preparations. MeHg-exposed cortical slices evidenced the increase of hydrogen peroxide production, inhibition in MTT reduction and increased lactate formation. In addition, marked reduction of NADH dehydrogenase activity in cortical homogenates exposed to MeHg, during 15 or 60 minutes, was observed. Since the *in vivo* and *in vitro* MeHg-treatments induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress, the effect from co-administration of diphenyl diselenide - (PhSe)₂ - (subcutaneous administration; 5 μ mol/kg) was also investigated in MeHg-poisoned mice. (PhSe)₂ treatment prevented from ultrastructural changes, mitochondrial content and the inhibitory effect on CK activity on MeHg-exposed mice. Therefore, these data strongly indicate MeHg poisoning probably compromises cell viability, by inducing mitochondrial oxidative stress, which could induce, in turn, to a mitochondrial fusion in order to conserve brain energy status. Additionally, we have also demonstrated that impaired systemic platelet oxygen consumption is a sensitive and non-invasive marker of the brain energy deficits induced by MeHg poisoning, and brain mitochondrial parameters could be prevented by (PhSe)₂ co-administration.

Keywords: methylmercury, platelet mitochondrial respiration, mitochondrial dysfunction, diphenyl diselenide

1 INTRODUCTION

Mercury is a hazardous metal that is released into the environment from both natural and anthropogenic sources (ATSDR 1999, EPA 1997). Once in the aquatic environment, mercury is methylated by widespread sulphate-reducing bacteria into methylmercury (MeHg). MeHg is then, assimilated into the food chain and it biomagnifies upwards of 10-million fold through aquatic food chains (EPA 1997). Thus, the major dietary route of human exposure to MeHg is via ingestion of seafood for adults, via transplacental exposure to the fetus and maternal milk for infants. Dietary MeHg is almost totally absorbed by the human gastrointestinal tract and rapidly enters the bloodstream, easily crossing the blood–brain barrier and placenta (Clarkson 1997), and about 10% of the body content of MeHg is retained into the brain (Skerfving 1974). Then, the brain has been ascribed as the most important target from MeHg intoxication (Clarkson 2002).

MeHg exposure results in brain damage, and it is characterized by massive neurodegeneration. This is associated with disorganization of the cerebral cortex cytoarchitecture and severe atrophy of the folia from the cerebellum hemispheres (Choi 1989, Eto et al. 1999). Neurological sequelae include cerebellar ataxia, akathisia, spasticity, memory loss, dementia, blurred vision, visual field constriction, dysarthria, impaired hearing, smell and taste, tremors and depression (Choi 1989).

Brain susceptibility to MeHg toxicity appears to increase the intracellular calcium (Ca^{2+}) concentrations, reactive oxygen species (ROS) production and glutamate extracellular concentrations via inhibition of its uptake by astrocytes (Aschner et al. 2007, Farina 2011, Limke and Atchison 2002). In addition, because of MeHg electrophilic nature (LoPachin 2006), it easily binds and oxidizes glutathione or a broad variety of thiol-containing enzymes, including enzymes responsible for brain energetics, eliciting, therefore, mitochondrial dysfunction and cell death (Clarkson 1972, Rocha et al. 1993, Schutz and Skerfving 1975, Valentini et al. 2009). In line with this, our group has recently demonstrated that chronic exposure to MeHg impairs the brain complexes I, I-III and IV of the respiratory chain and creatine kinase activities, probably, by eliciting oxidative stress (Franco et al. 2009, Glaser et al. 2010a, Glaser et al. 2010b).

Mitochondria provide most of the energy for neurons through oxidative phosphorylation and are thus critical to neuronal function (Knott 2008). Besides the maintenance of cellular bioenergetics, the most important roles of this organelle in brain homeostasis are signaling processes, calcium homeostasis, cell cycle regulation, cell death (both apoptotic and necrotic) and thermogenesis (Pozzo-Miller et al. 1999). Mitochondria harbor the bulk of oxidative pathways which are packed in various redox carriers that may potentially leak single electrons to oxygen and convert it into superoxide anion, a progenitor ROS. Intracellular generation of ROS *per se* is an inevitable, and sometimes physiologically important, process (Turrens 1997). Hence, considering MeHg, once it was absorbed, accumulates preferentially in brain mitochondria (Mori et al. 2007), and elicits oxidative stress (Franco et al. 2009, Glaser et al. 2010b), it has been proposed this organelle as a sensitive target from MeHg pro-oxidative effects (Franco et al. 2009).

In order to counterbalance the toxicity of this metal, supplementation with organic and inorganic forms of selenium has been used *in vitro* and *in vivo*, mainly based on its indirect antioxidant properties - selenium is an integral component of the active site of antioxidant enzymes, including glutathione peroxidase (Rotruck et al. 1973) - as well as in the well-known antagonism between mercury and selenium in the biological systems (Gailer et al. 2000, Khan 2009). For example, the organic selenium derivative, diphenyl diselenide (PhSe)₂, exhibits antioxidant, hepatoprotective, antiulcer, antiinflammatory, antiatherogenic and neuroprotective activities (Burger et al. 2006, Chanaday et al. 2011, Hort et al. 2011, Nogueira and Rocha 2011, Rupil et al. 2012). These properties appear to be linked to the capacity to form a selenol intermediate during its metabolism, which can be mediated by its reduction to a selenol intermediate (reduced form) via direct interaction with thiols or through its reduction by thioredoxin reductase (de Freitas et al. 2009, de Freitas 2011).

Because the central nervous system represents a main target organ of MeHg toxicity, studies on the toxic effects of this compound toward other systems are less abundant. In addition, it is not known whether neuroprotective agents are also able to mitigate the potential systemic toxicity induced by MeHg, which could be of interest to discover peripheral markers able to predict the degree of neurotoxicity and neuroprotection in MeHg-exposed subjects. Therefore, in the present investigation, we have aimed to study the brain and systemic

toxic effects of MeHg oral and repeated exposure on brain and blood mitochondrial function and ultrastructure and the potential protective effect of (PhSe)₂ administration, in poisoned mice.

2 SAMPLES

2.1 Animals and Reagents

Male Swiss albino mice, 60 days old, obtained from the Central Animal House of the Centre for Biological Sciences, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianopolis - SC, Brazil, were used in the present investigation. The animals were maintained on a 12-h light/dark cycle (lights on 07:00.19:00 h) in a constant temperature (22 °C ± 1 °C) colony room, with free access to water and protein commercial chow (Nuvital-PR, Brazil). The experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Research (PP00084 e PP00373/CEUA) of the Universidade Federal de Santa Catarina, Florianopolis, SC, Brazil, and followed the Guiding Principles in the Use of Animals in Toxicology, adopted by the Society of Toxicology in July 1989. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Chemicals were of analytical grade and purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) except methylmercury (II) chloride which was obtained from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI). (PhSe)₂ was prepared and characterized by our group as previously described (Paulmier 1986). The chemical purity of (PhSe)₂ was determined by GC/HPLC (99.9% of purity). For brain tissue preparations, an Eppendorf 5415 R (Eppendorf, Hamburg, Germany) centrifuge was used. Mitochondrial content was performed in Zeiss Leo 906 E transmission electron microscope equipped with the digital camera Megaview III (Oberkochen, Germany). The respiratory chain complex, adenylate kinase, creatine kinase, pyruvate kinase and cell viability assay were performed in a Varian Cary 50 spectrophotometer (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) with temperature control. H₂O₂ production was quantified by using a Tecan Austria GmbH M200 (Tecan, Grodig/Salzburg, Austria) fluorescence spectrophotometer. The formation and release of lactate were measured through specific analyzer (YSI 2700 STAT, Yellow Springs, Ohio, USA).

2.2 *In vivo* MeHg protocols

Protocol 1: The first experimental protocol was performed on 30 animals randomly divided into three experimental groups as follows: control group (vehicle); MeHg 20 mg/L (20 ppm); MeHg 40 mg/L (40 ppm). The animals remained in these conditions for twenty-one days.

Protocol 2: The second protocol included additional treatments which involved the subcutaneous administration of (PhSe)₂ (5 µmol/kg). Therefore, 24 animals were divided into four experimental groups as follows: controls; MeHg 40 mg/L; (PhSe)₂, and MeHg plus (PhSe)₂. MeHg was diluted in tap water, and was freely available, and (PhSe)₂ was dissolved in dimethylsulfoxide and subcutaneously administrated (Yamamoto 1985). Control animals received vehicle injections (1 mL / kg body weight). This experimental schedule, which is also based on the long-term administration - twenty-one days - of MeHg 40 mg/L (diluted in drinking water), has been reported to lead to mercury brain toxic concentrations of 3 - 5 µg . g⁻¹ tissue (3 . 5 ppm) (Franco et al. 2006, Glaser et al. 2010b).

2.2.1 Behavioral tests. On the day of the experiments (i.e., after 21 days of consecutive MeHg administration), the animals were acclimatized in a sound-isolated room under low-intensity light (12 lux) for at least 2 h before the experimental procedures, which were carried out between 14:00 and 18:00 h in order to avoid circadian influence and any kind of stress that could have interfered with the animals behavior. The behavioral tests were conducted in independent groups of animals. Behavior was monitored through a video camera positioned above the apparatuses and the images were analyzed online, in an adjacent room, by an experienced experimenter who was blind to the experimental group of the animals tested. After each trial, the apparatuses were cleaned with ethanol solution (10% v/v) and dried with paper towels in order to avoid odor impregnation.

2.2.1.1 Object location task. The spatial memory of mice was inferred applying an object location task. The test is based on the spontaneous tendency of rodents, previously exposed to two identical objects, to later explore one of the objects - replaced in a novel location - for a longer time than they explore the non-displaced object, and this test has been used for the evaluation of spatial memory in mice (Assini et al. 2009,

Ferguson 2007). The experimental apparatus used in this study was an open-field box (50 cm wide x 50 cm deep x 40 cm high) made of transparent PVC, placed in a dimly lit (7 lux) and sound isolated room. Identical plastic rectangles (4 cm high x 4.5 cm wide) were used as objects. The protocol was based on the previously described by (Assini et al. 2009). The mice were placed in the center of the apparatus with two identical objects for 5 min. The objects were placed 7 cm away from the walls of the open field. Exploration of the objects was timed by a stopwatch when mice sniffed, whisked, or looked at the objects from no more than 1 cm away. After the training phase, the mice were removed from the apparatus for 90 min. After the inter-trial interval, one object was moved to a new location. The time spent by the animals exploring the objects in new (novel) and old (familiar) locations was recorded during 5 min. Training and test sessions were recorded and later analyzed. The locations of the objects were counterbalanced among the groups. In order to analyze the cognitive performance, a location index was calculated as previously described by (Murai et al. 2007): $(T_{\text{novel}} \times 100) / (T_{\text{novel}} + T_{\text{familiar}})$, where T_{novel} is the time spent exploring the displaced object and T_{familiar} is the time spent exploring the nondisplaced object. The object location task was analyzed by one-sample t tests to determine whether the location index was different from chance performance (50 %).

2.2.1.2 Open field test. The open field test was used to evaluate general locomotor activity of the mice. The apparatus was made of Plexiglas, with a black-painted floor of 50 cm x 50 cm and transparent 15 cm-high walls. Animals were placed in the center of open-field and allowed to freely explore it for 5 min. The videos made were analyzed using ANY-Maze software (Stoelting Co., Wood Dale, IL) to determine the total distance traveled and the average speed (Aguilar et al. 2009).

2.2.1.3 Rota-rod test. The rota-rod was used to evaluate the effects of MeHg treatment on the motor coordination of the animals. The accelerating rota-rod apparatus (Insight Scientific Equipments, Ribeirao Preto, SP, Brazil) consists of a grooved metal roller (2.5 cm in diameter) and separated 9-cm wide compartments elevated 16 cm. The spindle speed was increased from 5 to 60 rpm over a maximal period of 120 s, and the time spent on the accelerating rota-rod was determined. The animals that were able to perform for 30 - 120 s during the baseline

(performed 1 h before treatments) were chosen for the experiment. After the selection, control and MeHg groups were matched according to bodyweight and mean performance. With this procedure, the animals presented similar baseline values for all groups. Then, all animals were tested on the Rota-rod 21 days after vehicle or MeHg administration (Aguiar et al. 2009).

2.2.2 Brain preparations for measuring the respiratory chain complex and pyruvate kinase (PK) activity. The animals were killed by decapitation and the cerebral cortex was rapidly dissected and homogenized (1:20 w/v) in phosphate buffer, pH 7.4, containing 5 mM KH_2PO_4 , 0.3 M sucrose, 5 mM MOPS, 1mM EGTA and 0.1% albumin. Tissue homogenates were centrifuged at $1.000 \times g$ at 4°C for 10 min. The pellet was discarded and the supernatants were used for measuring the respiratory chain complex activities (Latini et al. 2005b).

2.2.3 Brain preparations for measuring mitochondrial creatine kinase (mCK) and adenylate kinase (AK) activities. Part of the supernatant prepared for measuring the respiratory chain complex activities was centrifuged again at $17.000 \times g$ at 4°C for 10 min (Latini et al. 2005b). The pellet represented the mitochondrial fraction was washed twice with 10 mM Tris isotonic buffer containing 0.25 M sucrose and finally suspended in 100 mM Tris buffer, pH 7.5, containing 9 mM MgSO_4 .

2.2.4 Platelet preparation for high-resolution respirometry. Mice were anesthetized with ketamine (55 mg/kg) and xylazine (11 mg/kg) for cardiac puncture blood sample collection (Frankenberg 1979), using a 1 mL syringe, a 22 gauge needle and sodium citrate as anticoagulant. Platelets were freshly prepared by centrifugation 15 minutes at $500 \times g$ resulting in platelet-rich plasma (adapted from Sjoval et al. 2010).

2.3 *In vitro* MeHg protocols

For *in vitro* experiments, cortical supernatants or slices were incubated with crescents concentrations of MeHg (0-1500 μM). Cortical supernatants were incubated with MeHg for 15 and 60 minutes at 37°C , and cortical slices were exposed to MeHg for 60 minutes at 37°C in a medium with Krebs buffer, pH 7.4 containing 122 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.2 mM MgSO_4 , 0.4 mM KH_2PO_4 , 1.3 mM CaCl_2 , 25 mM

NaHCO₃ and 10 mM glucose. The control group did not contain MeHg. MeHg was solubilized in phosphate buffer 100 mM, pH 7.4. By using this large range of MeHg concentration, we determined the necessary MeHg concentration to reduce 50% (IC₅₀) NADH dehydrogenase (complex I) activity (Dixon 1964, Latini et al. 2005a).

2.3.1 Sample preparation. After cerebral cortex been dissected in ice-cold, supernatants were prepared as described above and transverse sections (slices of 400 µm) were obtained using a McIlwain Tissue Chopper. Cortical slices were transferred to a 96-well culture plate and pre-incubated under 95% O₂/5% CO₂ for 30 minutes at 37 ° C in a medium with Krebs buffer, pH 7.4 containing 122 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 0.4 mM KH₂PO₄, 1.3 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃ and 10 mM glucose. Then, the medium of the wells was changed and the cortical slices were exposed to MeHg.

2.4 METHODS

2.4.1 Measurement of the respiratory chain enzyme activities. NADH dehydrogenase activity, including complex I activity, was measured by the rate of NADH-dependent ferricyanide reduction at 420 nm (1 mM⁻¹ · cm⁻¹), as previously described (Cassina and Radi 1996). The activities of succinate-2,6-dichloroindophenol (DCIP)-oxidoreductase (complex II) and succinate:cytochrome c oxidoreductase (complex II-CoQ-complex III) were determined according to the method of Fischer et al. (1985). The methods described to measure these activities were slightly modified, as detailed in a previous report (Latini et al. 2005b). The activities of the respiratory chain complexes were calculated as nmol/min/mg protein.

2.4.2 Measurement of kinases activities. Creatine kinase (CK) activity was assessed spectrophotometrically based on the creatine formation, which was quantified according to the colorimetric method of Hughes (1962). Pyruvate kinase (PK) activity was assayed essentially as described by Leong et al. (1981) and adenylate kinase (AK) activity was measured as described by Dzeja et al. (1999). Enzyme activities were expressed as nmol/min/mg protein.

2.4.3 Electron microscopy and morphometry. To investigate the effect of repeated MeHg oral administration on the mitochondrial ultrastructural morphology, frontal cortex was fixed by cardiac perfusion of 1.5% glutaraldehyde, 1.5% formaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.35. The fixed brains were excised and placed in fresh fixative solution for an additional 4 h at room temperature. After that, the blocks were placed in cacodylate buffer containing 1% OsO₄ for 1 h, before being stained in block with 1% uranyl acetate in 0.1 acetate buffer pH 5.2 for 20 min. After dehydration with a series of graded cold acetones, the blocks were embedded in araldite. Thin sections were cut with a diamond knife on a JEOL JUM-7 ultramicrotome (Nikon, Tokyo, Japan) and examined using a Zeiss Leo 906 E electron microscope equipped with the digital camera Megaview III (Oberkochen, Germany). For quantitative analysis of mitochondrial content, three brains for each experimental condition were used and fifty random micrographs of the same brain region were acquired at a final magnification of X 10,000 and downloaded into digital image analytical software (Image J). The data were expressed as the mean of mitochondrial content (50 micrograph/experimental condition). The Software Image J was used and the relationship between mitochondria number/10 μm^2 of brain tissue was established with the aim to consider a constant area.

2.4.4 High-resolution respirometry. Measurement of platelet mitochondrial respiration was performed in a high-resolution oxygraph (Oxygraph-2k Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) at 37 ° C. Platelets were suspended in the 2 mL glass chamber at a concentration of 200,000 platelets/mL. Calibration with air-saturated Millipore water was performed daily. Data was collected using software displaying real-time oxygen concentration and oxygen flux (DatLab software 4.3, Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). Respiration was first allowed to stabilize without any substrates addition at a routine state, that is, in the physiological coupling state controlled by cellular energy demands on oxidative phosphorylation (indicated as Respiration). Then the ATP synthase inhibitor, oligomycin, was added to reveal respiration independent of ADP phosphorylation (oligomycin-induced state 4, henceforth denoted as state 4). To evaluate maximal capacity of the electron transfer system (ETS) the protonophore, carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP) was titrated until no

further increase in respiration was detected. To determine the relative contribution of the different respiratory states, a control ratio was calculated as the ratio of maximal FCCP-stimulated respiration and state 4 respiration (Sjovall et al. 2010).

2.4.5 Viability assay. MTT (3[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) assay was used to evaluate the cellular viability of cortical slices. Mitochondrial enzymes in metabolically active cells can decompose the tetrazolium salt to a colored formazan product. After 1 hour of incubation with MeHg, 0.2 mL from a solution 0.5 mg/mL of MTT in water was added to each well, and the plates were incubated at 37° C for 30 minutes. The medium was then carefully removed, and the purple products were dissolved in 0.2 mL dimethyl sulfoxide (DMSO). The plates were incubated for 30 minutes, and the optical density (OD) of the dissolved solute was measured in an ELISA reader spectrophotometrically at 570 nm (Mosmann 1983).

2.4.6 Lactate release determination. The formation and release of lactate were measured in the supernatant of cortical slices MeHg-exposed during 1 hour at 37 ° C through a specific analyzer (YSI 2700 STAT, Yellow Springs, Ohio, USA). The results were calculated as mmol/L and expressed as percentage of controls.

2.4.7 Determination of hydrogen peroxide (H_2O_2) generation. H_2O_2 production was determined as previously reported (Barja 2002). The method is based on the formation of a fluorescent dimmer through the reaction between H_2O_2 and homovanilic acid, which are substrates for the enzyme horseradish peroxidase (HRP). Cortical slices were incubated during 1 hour at 37 ° C with MeHg in a solution containing 137 mM NaCl, 40 mM KCl, 0.25 mM Na_2HPO_4 , 0.44 mM KH_2PO_4 , 1.3 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgSO_4$, 4.2 mM $NaHCO_3$. Afterwards, this medium was removed and 6 U/mL horseradish peroxidase, 0.1 mM homovanilic acid, 5 mM sodium succinate and 2 μ M rotenone were added to the MeHg-treated cortical slices. After 15 min of incubation at 37 ° C the reaction was stopped by adding 0.1 M glycine solution pH 10, and the fluorescence was measured by using excitation and emission wavelengths of 321 and 421 nm, respectively. H_2O_2 production was expressed as percentage of controls.

2.4.8 Protein determination. Sample protein content was determined by the method of Lowry using bovine serum albumin as the standard (Lowry et al. 1951).

2.5 Statistical analysis. Results are presented as mean \pm standard deviation. Data from animal behavior and from biochemical determinations were analyzed using one-way ANOVA followed by the post hoc Tukey test when F was significant. Only significant F values are given in the text. For analysis of dosedependent effects, linear regression was used. In some cases results from animals treated with MeHg 40mg/L were compared to controls, and for this purpose the Student t test for unpaired samples were used. Pearson correlation, r , was analyzed between the activities of the brain respiratory chain complexes and peripheral platelets oxygen consumption parameters, or with cognitive impairments. Differences between the groups were rated significant at $P < 0.05$. Statistics were performed using SPSSR (Statistical Package for the Social Sciences software; version 16.0 for Windows). All graphs were performed by using GraphPad Prism 5®.

3 RESULTS

MeHg-induced spatial memory deficits

Figures 1A to D show the effect of the oral and long-term MeHg exposure (20 and 40 mg/L) on mouse behavior. The spatial reference memory of mice was investigated by using an object location task. Figure 1A shows that mice receiving the high MeHg dose (40 mg/L) were not able to identify the spatial alteration in the open field, while controls and 20 mg/L MeHg-treated mice explored for a longer time the object replaced in a novel location than the non-displaced object [$F_{(2,27)}=3.87$; $P < 0.05$]. This spatial memory impairment was not linked to exploratory behavior deficits, since there were no significant differences on total investigation times of both objects among groups in the test trial (data not shown). Figures 1B, C and D show that both average speed and distance travelled in the open field or the latency to fall from the accelerating Rota-rod were not altered in mice receiving MeHg. In addition, Figure 2A shows a significant correlation between mice cognitive impairment and mitochondrial platelet dysfunction [$r=-0.81$; $P < 0.01$].

MeHg-poisoning on brain energetics

Figure 3A shows that the toxicant exposure significantly impaired the respiratory chain activity in mouse cerebral cortex homogenates. NADH dehydrogenases (including complex I NADH dehydrogenase linked activity; up to 27 % inhibition), complexes II (up to 37 % of inhibition) and II to III (up to 34 % of inhibition) activities were significantly reduced in brain from MeHg exposed animals [NADH dehydrogenases: $F_{(2,17)}=10.27$; $P < 0.001$; Complex II: $F_{(2,15)}=10.46$; $P < 0.001$; Complex II-III: $F_{(2,14)}=13.62$; $P < 0.001$]. Beside the central effect of MeHg on mitochondrial respiratory complexes activities, the mercurial also induced deleterious effects on peripheral platelet mitochondrial function. Figure 3B shows that MeHg treatment increased basal respiration (up to 62 % of increment) [$F_{(2,6)}=5.22$; $P < 0.05$] (oxygen consumption without the addition of substrates). This effect was also observed when platelets were exposed to oligomycin, indicating a mild contribution of ATP synthase (Complex V activity) to basal respiration (up to 62 % of increment) [$t_{(4)}= 2.97$; $P < 0.05$] (Figure 3C). In addition, under FCCP stimulated respiration, MeHg exposure provoked a significant inhibition of the mitochondrial electron transferring capacity (Figure 3D; up to 27 % of inhibition) [$F_{(2,3)}= 29.82$; $P < 0.05$]. The ratio between FCCP-titrated maximal respiration vs. state 4 respiration, the mitochondrial control ratio, was significantly decreased in mice receiving MeHg (40 mg/L) [$t_{(2)}= 6.14$; $P < 0.05$] (Figure 3E). Additionally, the increased basal respiration significantly correlated with reduced brain activities of the mitochondrial respiratory chain (platelet basal respiration vs. cortical complex I activity $r^2= -0.74$, $P < 0.05$; vs. cortical complex II activity $r^2= -0.80$, $P < 0.01$; vs. cortical complex II-III activity $r^2= -0.73$, $P < 0.05$) (Figures 2B, C and D).

Considering that dehydrogenase activities are essential for proper cell function, the effect of the toxicant on the cellular energy metabolism was investigated in detail in MeHg-exposed mouse brain homogenates (0 - 1500 μM). Figure 4A shows that NADH dehydrogenase activity was markedly reduced by MeHg after 15 min [$F_{(6,21)}=7.69$; $P < 0.0001$] or 60 min [$F_{(6,21)}=6.98$; $P < 0.0001$] of pre-incubation. In addition, the MeHg inhibitory effect was in a dose-dependent manner (15 min pre-incubation: $\beta_{(\text{linear regression})}= -0.81$, $P < 0.0001$; 60 min pre-incubation: $\beta_{(\text{linear regression})}= -0.74$, $P < 0.0001$). Figure 4A also shows the high

sensitivity of these dehydrogenases to the pre-incubation conditions, since MeHg elicited the same inhibitory pattern after 15 or 60 min pre-incubation on these dehydrogenases activities (control values at 15 min of pre-incubation: 296 ± 61 nmol / min / mg protein; 60 min of pre-incubation: 190 ± 32 nmol / min / mg protein).

The IC_{50} (MeHg concentration necessary to reduce 50% of NADH dehydrogenase activity) value calculated for the NADH dehydrogenase inhibition induced by MeHg-60 min-exposure was 482 ± 2 μ M (Figure 4A).

MeHg is a high electrophilic compound; therefore, many mitochondrial enzymes and/or low molecular weight compounds, including CK, NADH dehydrogenases and/or glutathione, would be cellular targets of the mercurial, eliciting therefore, oxidative stress and mitochondrial dysfunction. In this context, Figure 4B shows that the reduction of MTT (an index of cell viability) by cellular and mitochondrial dehydrogenases from mouse cortical slices was severely compromised by MeHg exposure (60 min of exposure) [$F_{(6,14)} = 36.24$; $P < 0.001$]. Furthermore, the inhibitory effect of MeHg on MTT reduction was accompanied by increased lactate formation at concentrations lower than 100 μ M MeHg (up to 19 % of increment) [$F_{(7,31)} = 7.21$; $P < 0.01$] (Figure 4C). However, higher concentrations of the mercurial also elicited an inhibitory effect of anaerobic glycolysis leading to a significant reduction of lactate formation (up to 68 % of reduction; Figure 4C). Additionally, Figure 4D shows that MeHg induced increased generation of H_2O_2 by mouse cortical slices exposed to MeHg for 60 min [$F_{(6,14)} = 21.57$; $P < 0.001$], and this effect was in a concentration-dependent manner [$\beta_{(linear\ regression)} = -0.88$; $P < 0.001$] (Figure 4D).

Altered mitochondrial ultrastructure, diminished content and energetics in cerebral cortex from MeHg-poisoned mice are prevented by (PhSe)₂ administration

Figures 5A - F show the effect of (PhSe)₂ on the mitochondrial ultrastructure, content and energetics in cerebral cortex from MeHg-poisoned mice. Figure 5A shows numerous cortical mitochondria with spherical or oval profile, with delimited intermembrane space, and clear projections of the inner membrane protruding into the matrix to form the cristae (Figure 5E). It is shown in Figures 5C, F and G that MeHg

exposure promoted several ultrastructural changes in the mitochondria and a significant reduction in the number of cortical mitochondria. The most prominent mitochondrial ultrastructure alteration consisted in organelle enlargement with greater volume (Figure 5F) and the adoption of different forms: curved, S-shaped and markedly elongated. Moreover, the electron microscopy analysis also revealed a subtle presence of a fluffy material in mitochondrial matrix and a clear disorganization of mitochondrial crista in brain from MeHg poisoned mice (Figure 5F). In addition, Figure 5G shows that the MeHg-induced mitochondrial content reduction (up to 53 % of reduction) was significantly prevented by (PhSe)₂ treatment [$F_{(3,146)}=58.19$; $P < 0.0001$]. Moreover, (PhSe)₂ alone or when co-administered with MeHg, significantly stimulated mitochondrial biogenesis as shown by the increased number of this organelle in the mouse-exposed brain (up to 56 % of increment induced by (PhSe)₂ per se, and up to 46 % of increment in MeHg + (PhSe)₂ treated animals). Similarly, the MeHg-induced abolishment of the activity of the mitochondrial isoform of the brain key energy enzyme, CK, (up to 97 % of inhibition) was significantly prevented by (PhSe)₂ treatment (up to 69 % of prevention) [$F_{(3,8)}= 44.29$; $P < 0.0001$]. However, AK and PK activities were not altered by the treatments (Figure 5H).

4 DISCUSSION

MeHg poisoning has a pattern of neurological damage that has been associated with degeneration of the cerebellar granule cell layer and the calcarine region from the occipital cortex, in humans (Choi et al. 1978, Eto et al. 1999, Hunter and Russell 1954, Takeuchi 1982), and also, in rodent brains (Nagashima 1997). The main researched mechanisms linked to these nervous system alterations are mostly associated with intracellular calcium homeostasis impairment (Sirois and Atchison 2000), glutamate homeostasis alteration and oxidative stress induction (Aschner et al. 2007, Farina 2011). Our study broads the spectrum of impaired brain systems in MeHg-exposed mice by providing evidence that a continuous MeHg (21 days) administration disrupts central and systemic energy metabolism by altering the ultrastructural morphology and content of the cerebral cortex mitochondria, and by reducing the metabolic activity of this organelle in the brain (cerebral cortex) and periphery (systemic platelets).

Furthermore, this MeHg-induced impaired energetic appears to elicit also cognitive impairments, since poisoned animals showed memory deficits. Here, it is also demonstrated that MeHg-mitotoxic effects could be attenuated if the selenium compound, (PhSe)₂, was also administered.

It has been previously demonstrated by our group the experimental model utilized in the present investigation causes significant neurotoxicity, evaluated by behavioural and cortical and cerebellar neurochemical parameters (de Freitas et al. 2009, Dietrich et al. 2005, Farina et al. 2003, Franco et al. 2006, Franco et al. 2007b, Franco et al. 2009, Franco et al. 2010, Glaser et al. 2010b). Also, we have added new information about this model showing that long-term oral MeHg administration induced significant cognitive alterations (Figure 1A). These results are in agreement with previous experimental data showing that MeHg induces impairments in short-term memory and motivation-driven behaviors in mice and rats (Maia Cdo et al. 2010, Onishchenko et al. 2007). Furthermore, the altered behavior is also in line with epidemiological studies evidencing cognitive impairment in humans who were exposed to MeHg (Grandjean et al. 1997, Grandjean et al. 1998, Grandjean et al. 1999). It is noteworthy the observed memory deficits were significantly correlated with the systemic increased oxygen consumption by platelets, which could be considered as a marker for dysfunctional mitochondrial metabolism (Figure 2A and Figure 3C). Moreover, MeHg-elicited altered systemic respiration was also correlated with reduced cortical mitochondrial content and function (Figure 2B-D; Figure 5G-H), suggesting mitochondria alteration might represent an important hallmark on MeHg-induced cognitive impairment. Therefore, it is feasible to propose the use of platelet respiration, in addition to the measurement of mercury levels, as a surrogate peripheral marker to predict neurotoxicity in MeHg-exposed individuals. The use of this systemic finding could be supported by the following observation: diseases with severe neurodegeneration also present systemic bioenergetics alterations, i.e. in Parkinson disease (PD), the brain energetic impairment - reduction of complex I activity of the respiratory chain – it has been consistently seen in platelets from PD affected patients (Krige et al. 1992, Mann et al. 1992).

Considerable interest is growing in the development of biomarkers of MeHg exposure that could provide early warning signs of MeHg neurotoxicity, before occurring considerable damage to the nervous system. However, only few reports, in the literature, could

demonstrate a clear relationship between MeHg-induced central and peripheral effects. The main difficulty found by researchers has been the inaccessibility of brain tissue for sampling. But, a sensitive approach to this trouble has been in some cases, the use of peripheral blood cells, in particular the platelets. In this context, platelets have been routinely used in pharmacological studies as models of nerve endings because they contain and release neurotransmitters and they have receptors for neurotransmitters on their surface (Ally et al. 1993, Chakrabarti et al. 1998). Furthermore, it has been proposed these blood elements may serve as a marker for changes in mitochondrial function occurring in senescence and ageing-related diseases (Merlo Pich et al. 1996, Xu et al. 2007). Then, in this investigation, apart from measuring brain energetics after long term MeHg exposure, we also assessed platelet respiration. As previously reported by our group and others (Franco et al. 2007a, Glaser et al. 2010b, Yoshino et al. 1966), MeHg exposure induces energy metabolism impairment, which is characterized by a reduced activity of the mitochondrial respiratory chain. These alterations were found in the brain (Figure 3A), and also visualized in platelets from MeHg poisoned animals (Figure 3B-D), and both of them were significantly correlated (Figure 2B-D). The increased platelet basal respiration points to higher energy demand on mitochondrial oxidative phosphorylation (Figure 3B), probably, due to uncoupled mitochondria, or low levels of cellular ATP. This is also in line with the increased state IV respiration (when the oxidation of respiratory substrates is not coupled to ATP synthesis; use of oligomycin, in Figure 3C), observed in platelets from poisoned mice, and mechanistically, this could be mainly linked to proton leak (Gnaiger 2007). Additionally, ROS formation and the induction of mitochondrial permeability transition pore could also contribute, to some extent to the increase of oxygen consumption, and these two processes have been extensively demonstrated after MeHg exposure (Figure 4D) (Franco et al. 2009, Glaser et al. 2010a, Glaser et al. 2010b, Mori et al. 2007). The activation of the latter mechanism leads to loss of mitochondrial matrix substrates as well as dissipation of the proton-motive force which uncouples and inhibits respiration (Nicholls 2004). This is consistent with the inhibition of respiration under FCCP (Figure 3D). This inhibition in oxygen consumption could also be related to the observation of reduced mitochondria content (Figure 5G) and/or inhibition in the respiratory chain complexes (Figure 3A) on MeHg-treated animals.

On the other side, for a better understanding about the mechanisms involved in the MeHg induced cortico-cerebral energy alterations, we have exposed brain preparations to crescent MeHg concentration. We have observed a significant dose-dependent inhibition of NADH dehydrogenase activity (complex I activity) after short periods of incubation, indicating the susceptibility from this enzyme to MeHg. Considering that complex I is the rate-limiting enzyme in oxidative phosphorylation (Chinopoulos and Adam-Vizi 2001), a reduced activity of this complex may have a direct impact on the overall energy state from the cell. Consequently, it is feasible the electron transfer chain impairment could play a critical role in the initiation of neuronal deterioration by limiting energy production and promoting oxidative stress, which is in agreement with the stimulation of anaerobic glycolysis (lower concentrations of MeHg) and increased H_2O_2 production (Figure 4C-D). MeHg-induction of cortical mitochondrial oxidative stress probably provoked the inhibition of CK activity. In this context, previous reports have pointed out this enzyme is essential to maintain the development and regulation of cerebral functions, thence, changes in its activity may represent an important step in the toxic mechanisms leading to neurodegeneration (Glaser et al. 2010a, Glaser et al. 2010b, Tomimoto et al. 1993, Wendt et al. 2002). Moreover, the active site of CK contains a cysteinyl residue that is critical for substrate binding (Kenyon 1996). Consequently, this enzyme is highly susceptible to inactivation by oxidative reactions (Yuan et al. 1992).

The effects of MeHg and/or $(PhSe)_2$ treatment on the morphological profile of mitochondria represent a significant novelty of this study. In fact, although some studies have shown MeHg is toxic to mitochondria (Glaser et al. 2010b, Mori et al. 2007), this is the first one to evidence the number and morphological mitochondrial profiles have changed after MeHg exposure (Figure 5G). This should be involved with the increased oxidative stress and energetic deficit that was observed on experimental models from MeHg poisoning (Farina 2011). Since the number of mitochondria was reduced and the morphology depicted tubular mitochondria, it could be also proposed mitochondrial fusion was induced by MeHg poisoning. In this context, fusion of mitochondria is a process required for the intramitochondrial exchange of metabolic substrates and maintenance of respiratory capacity (Skulachev 2001). Therefore, under situations of energy deficiency mitochondrial fusion might serve to mix and unify mitochondrial

compartments, which allows the complementation of mtDNA and counteracts respiratory deficiencies (Chen et al. 2010, Ono et al. 2001).

This investigation also gives information about mitogenic properties of (PhSe)₂, and this result could be involved in its beneficial effects against pathological conditions related to energetic misbalances, including antioxidant, anti-inflammatory, antinociceptive, and antihypercholesterolemic effects previously described (Burger et al. 2006, de Freitas et al. 2009, de Freitas 2011, Nogueira 2011). Increased mitochondrial content, in the cerebral cortex of (PhSe)₂-treated mice, represents an intriguing finding of this study, and deserves additional research.

Summarizing, the presented findings corroborate previous data showing that MeHg induced brain mitochondrial oxidative stress (Glaser et al. 2010b, Mori et al. 2007, Roos et al. 2011), add new concepts in the field of MeHg-toxicity, evidencing that i) the number of mitochondria is reduced in the cerebral cortex, ii) the morphology of mitochondria is altered, indicating the induction of fusion; iii) mitochondrial respiration is systemically perturbed as it is shown by the impaired platelet oxygen consumption; iv) systemic mitochondrial alterations correlate with central events, and v) (PhSe)₂ alone modulates mitochondrial homeostasis by increasing the number of mitochondria, which could be related to its previously reported beneficial effects.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Roberto Galeano, for checking the language of this manuscript. This work was supported by grants from FAPESC (Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), INCT for Excitotoxicity and Neuroprotection-MCT/CNPq, CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and NENASC/PRONEX (Núcleo de Excelência em Neurociências Aplicadas de Santa Catarina / Programa de Apoio a Núcleos de Excelência). Wannmacher CMD, Prediger RDS, de Bem AF, Rocha JBT, Farina M, and Latini A are CNPq fellows.

REFERENCES

- Aguiar AS, Jr., Araujo AL, da-Cunha TR, Speck AE, Ignacio ZM, De-Mello N, Prediger RD (2009) Physical exercise improves motor and short-term social memory deficits in reserpinized rats. *Brain Res Bull* 79:452-457.
- Ally A, Buist R, Mills P, Reuhl K (1993) Effects of methylmercury and trimethyltin on cardiac, platelet, and aorta eicosanoid biosynthesis and platelet serotonin release. *Pharmacol Biochem Behav* 44:555-563.
- Aschner M, Syversen T, Souza DO, Rocha JB, Farina M (2007) Involvement of glutamate and reactive oxygen species in methylmercury neurotoxicity. *Braz J Med Biol Res* 40:285-291.
- Assini FL, Duzzioni M, Takahashi RN (2009) Object location memory in mice: pharmacological validation and further evidence of hippocampal CA1 participation. *Behav Brain Res* 204:206-211.
- ATSDR, (1999) Public Health Statement for Mercury. In: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA, Vol. pp.
- Barja G (2002) The quantitative measurement of H₂O₂ generation in isolated mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 34:227-233.
- Burger ME, Fachinetto R, Wagner C, Perottoni J, Pereira RP, Zeni G, Rocha JB (2006) Effects of diphenyl-diselenide on orofacial dyskinesia model in rats. *Brain Res Bull* 70:165-170.
- Cassina A, Radi R (1996) Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys* 328:309-316.
- Chakrabarti SK, Loua KM, Bai C, Durham H, Panisset JC (1998) Modulation of monoamine oxidase activity in different brain regions and platelets following exposure of rats to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol* 20:161-168.
- Chanaday NL, de Bem AF, Roth GA (2011) Effect of diphenyl diselenide on the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurochem Int* 59:1155-1162.
- Chen H, Vermulst M, Wang YE, Chomyn A, Prolla TA, McCaffery JM, Chan DC (2010) Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell* 141:280-289.
- Chinopoulos C, Adam-Vizi V (2001) Mitochondria deficient in complex I activity are depolarized by hydrogen peroxide in nerve

- terminals: relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem* 76:302-306.
- Choi BH, Lapham LW, Amin-Zaki L, Saleem T (1978) Abnormal neuronal migration, deranged cerebral cortical organization, and diffuse white matter astrocytosis of human fetal brain: a major effect of methylmercury poisoning in utero. *J Neuropathol Exp Neurol* 37:719-733.
- Choi BH (1989) The effects of methylmercury on the developing brain. *Prog Neurobiol* 32:447-470.
- Clarkson TW (1972) The pharmacology of mercury compounds. *Annu Rev Pharmacol* 12:375-406.
- Clarkson TW (1997) The toxicology of mercury. *Crit Rev Clin Lab Sci* 34:369-403.
- Clarkson TW (2002) The three modern faces of mercury. *Environ Health Perspect* 110 Suppl 1:11-23.
- de Freitas AS, Funck VR, Rotta Mdos S, Bohrer D, Morschbacher V, Puntel RL, Nogueira CW, Farina M, Aschner M, Rocha JB (2009) Diphenyl diselenide, a simple organoselenium compound, decreases methylmercury-induced cerebral, hepatic and renal oxidative stress and mercury deposition in adult mice. *Brain Res Bull* 79:77-84.
- de Freitas AS, Rocha, J. B. (2011) Diphenyl diselenide and analogs are substrates of cerebral rat thioredoxin reductase: a pathway for their neuroprotective effects. *Neurosci Lett* 503:1-5.
- Dietrich MO, Mantese CE, dos Anjos G, Souza DO, Farina M (2005) Motor impairment induced by oral exposure to methylmercury in adult mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 19:169-175.
- Dixon M, Webb, E.C., (1964). *Enzymes*. In Book *Enzymes*., Longmans, London, Vol. pp.
- Dzeja PP, Vitkevicius KT, Redfield MM, Burnett JC, Terzic A (1999) Adenylate kinase-catalyzed phosphotransfer in the myocardium : increased contribution in heart failure. *Circ Res* 84:1137-1143.
- EPA, (1997) Mercury Study Report to Congress. U.S. In: *Environmental Protection Agency*, Washington, DC, Vol. pp.
- Eto K, Takizawa Y, Akagi H, Haraguchi K, Asano S, Takahata N, Tokunaga H (1999) Differential diagnosis between organic and inorganic mercury poisoning in human cases--the pathologic point of view. *Toxicol Pathol* 27:664-671.

- Farina M, Brandao R, Lara FS, Soares FA, Souza DO, Rocha JB (2003) Mechanisms of the inhibitory effects of selenium and mercury on the activity of delta-aminolevulinate dehydratase from mouse liver, kidney and brain. *Toxicol Lett* 139:55-66.
- Farina MA, M.; Rocha, J.B.T. (2011) Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 256:405-417.
- Ferguson D, Sapolsky, R. (2007) Mineralocorticoid receptor overexpression differentially modulates specific phases of spatial and nonspatial memory. *J Neurosci* 27:8046-8052.
- Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, Sengers RC, Janssen AJ (1985) Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta* 153:23-36.
- Franco JL, Teixeira A, Meotti FC, Ribas CM, Stringari J, Garcia Pomblum SC, Moro AM, Bohrer D, Bairo AV, Dafre AL, Santos AR, Farina M (2006) Cerebellar thiol status and motor deficit after lactational exposure to methylmercury. *Environ Res* 102:22-28.
- Franco JL, Braga HC, Stringari J, Missau FC, Posser T, Mendes BG, Leal RB, Santos AR, Dafre AL, Pizzolatti MG, Farina M (2007a) Mercurial-induced hydrogen peroxide generation in mouse brain mitochondria: protective effects of quercetin. *Chem Res Toxicol* 20:1919-1926.
- Franco JL, Braga Hde C, Nunes AK, Ribas CM, Stringari J, Silva AP, Garcia Pomblum SC, Moro AM, Bohrer D, Santos AR, Dafre AL, Farina M (2007b) Lactational exposure to inorganic mercury: evidence of neurotoxic effects. *Neurotoxicol Teratol* 29:360-367.
- Franco JL, Posser T, Dunkley PR, Dickson PW, Mattos JJ, Martins R, Bairy AC, Marques MR, Dafre AL, Farina M (2009) Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. *Free Radic Biol Med* 47:449-457.
- Franco JL, Posser T, Missau F, Pizzolatti MG, Dos Santos AR, Souza DO, Aschner M, Rocha JB, Dafre AL, Farina M (2010) Structure-activity relationship of flavonoids derived from medicinal plants in preventing methylmercury-induced mitochondrial dysfunction. *Environ Toxicol Pharmacol* 30:272-278.

- Frankenberg L (1979) Cardiac puncture in the mouse through the anterior thoracic aperture. *Lab Anim* 13:311-312.
- Gailer J, George GN, Pickering IJ, Madden S, Prince RC, Yu EY, Denton MB, Younis HS, Aposhian HV (2000) Structural basis of the antagonism between inorganic mercury and selenium in mammals. *Chem Res Toxicol* 13:1135-1142.
- Glaser V, Leipnitz G, Stralioetto MR, Oliveira J, dos Santos VV, Wannmacher CM, de Bem AF, Rocha JB, Farina M, Latini A (2010a) Oxidative stress-mediated inhibition of brain creatine kinase activity by methylmercury. *Neurotoxicology* 31:454-460.
- Glaser V, Nazari EM, Muller YM, Feksa L, Wannmacher CM, Rocha JB, de Bem AF, Farina M, Latini A (2010b) Effects of inorganic selenium administration in methylmercury-induced neurotoxicity in mouse cerebral cortex. *Int J Dev Neurosci* 28:631-637.
- Gnaiger E, (2007). Mitochondrial Pathways and Respiratory Control. In Book Mitochondrial Pathways and Respiratory Control, OROBOROS MiPNet Publications, Innsbruck, Vol. pp.
- Grandjean P, Weihe P, White RF, Debes F, Araki S, Yokoyama K, Murata K, Sorensen N, Dahl R, Jorgensen PJ (1997) Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol* 19:417-428.
- Grandjean P, Weihe P, White RF, Debes F (1998) Cognitive performance of children prenatally exposed to "safe" levels of methylmercury. *Environ Res* 77:165-172.
- Grandjean P, Budtz-Jorgensen E, White RF, Jorgensen PJ, Weihe P, Debes F, Keiding N (1999) Methylmercury exposure biomarkers as indicators of neurotoxicity in children aged 7 years. *Am J Epidemiol* 150:301-305.
- Hort MA, Stralioetto MR, Netto PM, da Rocha JB, de Bem AF, Ribeiro-do-Valle RM (2011) Diphenyl diselenide effectively reduces atherosclerotic lesions in LDLr ^{-/-} mice by attenuation of oxidative stress and inflammation. *J Cardiovasc Pharmacol* 58:91-101.
- Hughes BP (1962) A method for the estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathological sera. *Clin Chim Acta* 7:597-603.
- Hunter D, Russell DS (1954) Focal cerebellar and cerebellar atrophy in a human subject due to organic mercury compounds. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 17:235-241.

- Kenyon GL (1996) Energy metabolism. Creatine kinase shapes up. *Nature* 381:281-282.
- Khan MA, Wang, F. (2009) Mercury-selenium compounds and their toxicological significance: toward a molecular understanding of the mercury-selenium antagonism. *Environ Toxicol Chem* 28:1567-1577.
- Knott AB, Bossy-Wetzel, E. (2008) Impairing the mitochondrial fission and fusion balance: a new mechanism of neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* 1147:283-292.
- Krige D, Carroll MT, Cooper JM, Marsden CD, Schapira AH (1992) Platelet mitochondrial function in Parkinson's disease. The Royal Kings and Queens Parkinson Disease Research Group. *Ann Neurol* 32:782-788.
- Latini A, da Silva CG, Ferreira GC, Schuck PF, Scussiato K, Sarkis JJ, Dutra Filho CS, Wyse AT, Wannmacher CM, Wajner M (2005a) Mitochondrial energy metabolism is markedly impaired by D-2-hydroxyglutaric acid in rat tissues. *Mol Genet Metab* 86:188-199.
- Latini A, Rodriguez M, Borba Rosa R, Scussiato K, Leipnitz G, Reis de Assis D, da Costa Ferreira G, Funchal C, Jacques-Silva MC, Buzin L, Giugliani R, Cassina A, Radi R, Wajner M (2005b) 3-Hydroxyglutaric acid moderately impairs energy metabolism in brain of young rats. *Neuroscience* 135:111-120.
- Leong SF, Lai JC, Lim L, Clark JB (1981) Energy-metabolizing enzymes in brain regions of adult and aging rats. *J Neurochem* 37:1548-1556.
- Limke TL, Atchison WD (2002) Acute exposure to methylmercury opens the mitochondrial permeability transition pore in rat cerebellar granule cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 178:52-61.
- LoPachin RM, Barber, D. S. (2006) Synaptic cysteine sulfhydryl groups as targets of electrophilic neurotoxicants. *Toxicol Sci* 94:240-255.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Maia Cdo S, Ferreira VM, Diniz JS, Carneiro FP, de Sousa JB, da Costa ET, Tomaz C (2010) Inhibitory avoidance acquisition in adult rats exposed to a combination of ethanol and methylmercury during central nervous system development. *Behav Brain Res* 211:191-197.

- Mann VM, Cooper JM, Krige D, Daniel SE, Schapira AH, Marsden CD (1992) Brain, skeletal muscle and platelet homogenate mitochondrial function in Parkinson's disease. *Brain* 115 (Pt 2):333-342.
- Merlo Pich M, Bovina C, Formiggini G, Cometti GG, Ghelli A, Parenti Castelli G, Genova ML, Marchetti M, Semeraro S, Lenaz G (1996) Inhibitor sensitivity of respiratory complex I in human platelets: a possible biomarker of ageing. *FEBS Lett* 380:176-178.
- Mori N, Yasutake A, Hirayama K (2007) Comparative study of activities in reactive oxygen species production/defense system in mitochondria of rat brain and liver, and their susceptibility to methylmercury toxicity. *Arch Toxicol* 81:769-776.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63.
- Murai T, Okuda S, Tanaka T, Ohta H (2007) Characteristics of object location memory in mice: Behavioral and pharmacological studies. *Physiol Behav* 90:116-124.
- Nagashima K (1997) A review of experimental methylmercury toxicity in rats: neuropathology and evidence for apoptosis. *Toxicol Pathol* 25:624-631.
- Nicholls DG (2004) Mitochondrial membrane potential and aging. *Aging Cell* 3:35-40.
- Nogueira CW, Rocha JB (2011) Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. *Arch Toxicol* 85:1313-1359.
- Nogueira CW, Rocha, J. B. (2011) Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. *Arch Toxicol* 85:1313-1359.
- Onishchenko N, Tamm C, Vahter M, Hokfelt T, Johnson JA, Johnson DA, Ceccatelli S (2007) Developmental exposure to methylmercury alters learning and induces depression-like behavior in male mice. *Toxicol Sci* 97:428-437.
- Ono T, Isobe K, Nakada K, Hayashi JI (2001) Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria. *Nat Genet* 28:272-275.

- Paulmier C, (1986) Selenoorganic functional groups. In: *Selenium Reagents and Intermediates in Organic Synthesis*, Pergamon Press, Oxford, England, Vol. pp. 25-51.
- Pozzo-Miller LD, Gottschalk W, Zhang L, McDermott K, Du J, Gopalakrishnan R, Oho C, Sheng ZH, Lu B (1999) Impairments in high-frequency transmission, synaptic vesicle docking, and synaptic protein distribution in the hippocampus of BDNF knockout mice. *J Neurosci* 19:4972-4983.
- Rocha JB, Freitas AJ, Marques MB, Pereira ME, Emanuelli T, Souza DO (1993) Effects of methylmercury exposure during the second stage of rapid postnatal brain growth on negative geotaxis and on delta-aminolevulinic acid dehydratase of suckling rats. *Braz J Med Biol Res* 26:1077-1083.
- Roos DH, Puntel RL, Farina M, Aschner M, Bohrer D, Rocha JB, de Vargas Barbosa NB (2011) Modulation of methylmercury uptake by methionine: prevention of mitochondrial dysfunction in rat liver slices by a mimicry mechanism. *Toxicol Appl Pharmacol* 252:28-35.
- Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG (1973) Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179:588-590.
- Rupil LL, de Bem AF, Roth GA (2012) Diphenyl diselenide-modulation of macrophage activation: Down-regulation of classical and alternative activation markers. *Innate Immun*
- Schutz A, Skerfving S (1975) Blood cell gamma-aminolevulinic acid dehydratase activity in humans exposed to methylmercury. *Scand J Work Environ Health* 1:54-59.
- Sirois JE, Atchison WD (2000) Methylmercury affects multiple subtypes of calcium channels in rat cerebellar granule cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 167:1-11.
- Sjovall F, Morota S, Hansson MJ, Friberg H, Gnaiger E, Elmer E (2010) Temporal increase of platelet mitochondrial respiration is negatively associated with clinical outcome in patients with sepsis. *Crit Care* 14:R214.
- Skerfving S (1974) Methylmercury exposure, mercury levels in blood and hair, and health status in Swedes consuming contaminated fish. *Toxicology* 2:3-23.

- Skulachev VP (2001) Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends Biochem Sci* 26:23-29.
- Takeuchi T (1982) Pathology of Minamata disease. With special reference to its pathogenesis. *Acta Pathol Jpn* 32 Suppl 1:73-99.
- Tomimoto H, Yamamoto K, Homburger HA, Yanagihara T (1993) Immunoelectron microscopic investigation of creatine kinase BB-isoenzyme after cerebral ischemia in gerbils. *Acta Neuropathol* 86:447-455.
- Turrens JF (1997) Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep* 17:3-8.
- Valentini J, Vicentini J, Grotto D, Tonello R, Garcia SC, Barbosa Jr F (2009) Sub-Chronic Exposure to Methylmercury at Low Levels Decreases Butyrylcholinesterase Activity in Rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*
- Wendt S, Dedeoglu A, Speer O, Wallimann T, Beal MF, Andreassen OA (2002) Reduced creatine kinase activity in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice. *Free Radic Biol Med* 32:920-926.
- Xu J, Shi C, Li Q, Wu J, Forster EL, Yew DT (2007) Mitochondrial dysfunction in platelets and hippocampi of senescence-accelerated mice. *J Bioenerg Biomembr* 39:195-202.
- Yamamoto I (1985) [Studies on the behavior of mercury and selenium in blood of mice injected with those elements]. *Hokkaido Igaku Zasshi* 60:227-240.
- Yoshino Y, Mozai T, Nakao K (1966) Biochemical changes in the brain in rats poisoned with an alkylmercury compound, with special reference to the inhibition of protein synthesis in brain cortex slices. *J Neurochem* 13:1223-1230.
- Yuan G, Kaneko M, Masuda H, Hon RB, Kobayashi A, Yamazaki N (1992) Decrease in heart Mitochondrial creatine kinase activity due to oxygen free radicals. *Biochim Biophys Acta* 1140:78-84.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1 Behavioral tests and motor profile from adult mice exposed to methylmercury (MeHg; 20 mg/L and 40mg/L): (A) location index in object location task (% of controls); (B) average speed (m/s) and (C) distance travelled at open-field test (m); (D) falling latency in Rota-rod apparatus (seconds). Values are mean \pm standard deviation from ten animals. * $P < 0.05$, compared to controls (One-way ANOVA followed by the post hoc test of Tukey).

Figure 2 Correlation studies between brain complex I (B), II (C) and II-III (D) activities or cognitive impairment (A) and platelet basal respiration. r = Pearson's correlation.

Figure 3 Energetics parameters in brain and platelets from adult mice exposed to methylmercury (MeHg; 20 mg/L and 40mg/L): (A) NADH dehydrogenase, complex II and complex II-III activities in MeHg-poisoned mouse cortical homogenates; (B) platelet basal respiration, (C) state IV respiration (under oligomycin effect), (D) maximal respiration (after FCCP addition) and (E) mitochondrial control ratio (between FCCP-titrated maximal respiration vs. state 4 respiration) in platelets. Values are mean \pm standard deviation from three to six animals. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared to controls (One-way ANOVA followed by the post hoc test of Tukey).

Figure 4 *In vitro* effect of methylmercury (MeHg) on mouse brain energetics parameters. (A) NADH dehydrogenase activity in cortical homogenates exposed to MeHg (0-1500 μ M) for 15 or 60 minutes; (B) MTT reduction and (D) mitochondrial H₂O₂ generation and (C) lactate release from mouse cortical slices exposed to MeHg (0-1500 μ M) for 60 minutes. Results were expressed as percentage of controls and values are mean \pm standard deviation from three animals. Control values for NADH dehydrogenase activity (A), 15 minutes of incubation 296 ± 61 μ mol/min/mg protein; 60 min of incubation 190 ± 32 μ mol / min / mg protein. Control values for lactate release (C) 0.50 ± 0.25 mmol / L. Control values for H₂O₂ production (D) $2,359 \pm 485$ fluorescence units/mg of protein. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared to controls (One-way ANOVA followed by the post hoc test of Tukey).

Figure 5 Mitochondrial ultrastructure in cerebral cortex from adult mice control (A); treated with diphenyl diselenide (PhSe)₂ (B); exposed to methylmercury (MeHg; 40mg/L) (C) and exposed to methylmercury (MeHg; 40mg/L) plus diphenyl diselenide (PhSe)₂ (D); figures (E) and (F) are enlarged photos from control and MeHg group, respectively. Control cortical sections show the presence of numerous round-shape mitochondria, some of them inside of

unmyelinated axons (asterisk; X10,000; **A**). Cortical sections from (PhSe)₂ treated mice show unchanged mitochondrial features axons (asterisk; X10,000; **B**). Images from cortical preparations from MeHg-treated mice display reduced number of mitochondria, and some of them characterized by a significant increase in their size (asterisk: elongated mitochondrion in a myelinated axon; X10,000; **C**). Brain preparations from MeHg plus (PhSe)₂ treated mice show the predominance of elliptical and round-shape mitochondria (asterisk) similar to those observed in (PhSe)₂ treated mice. Also, some of them exhibit a significant increase in their volume (X10,000; **D**). Control cortical sections from unmyelinated axons (asterisk) show the inner membrane forming cristae (asterisk; X47,000; **E**). An elongated and curved-shape mitochondria (asterisk) with a slight internal disorganization, particularly in its cristae (X 47,000; **F**). Cortical mitochondrial content were expressed as number of mitochondria/field (**G**). Adenylate kinase, pyruvate kinase and creatine kinase activities were expressed as nmol/ min/ mg protein (**H**). Values are mean \pm standard deviation from three animals. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, compared to controls; ### $P < 0.001$, compared to MeHg group (One-way ANOVA followed by the post hoc test of Tukey).

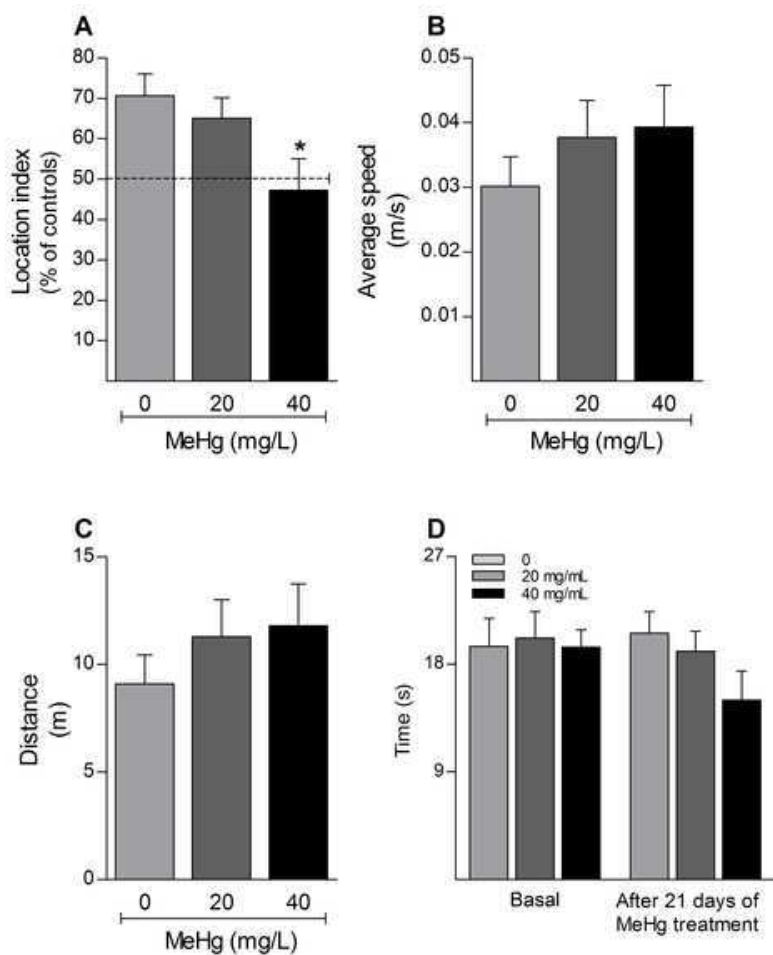
Figure 1

Figure 2

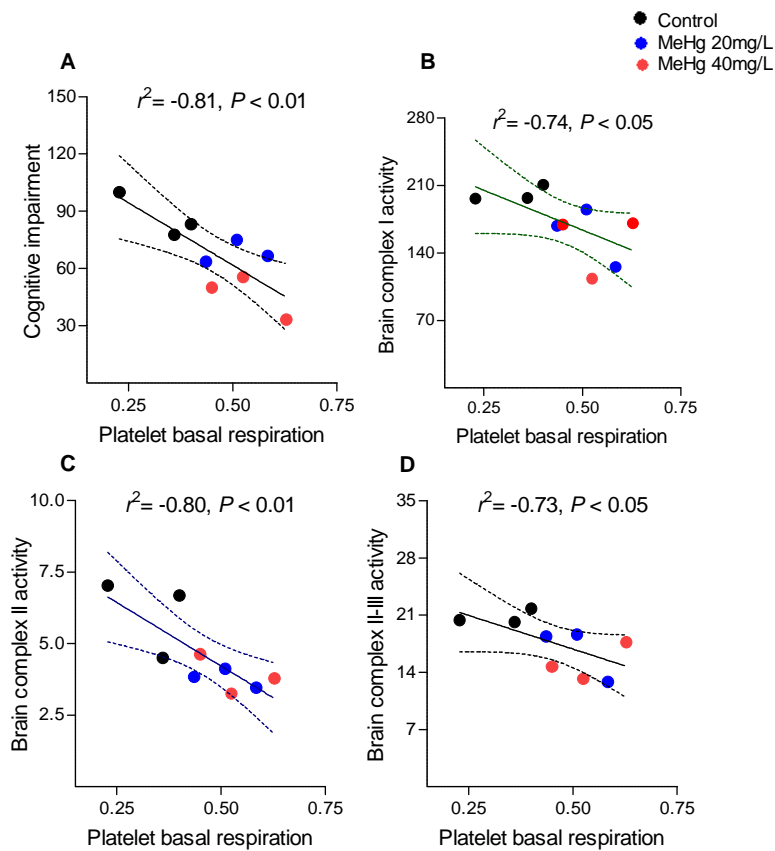


Figure 3

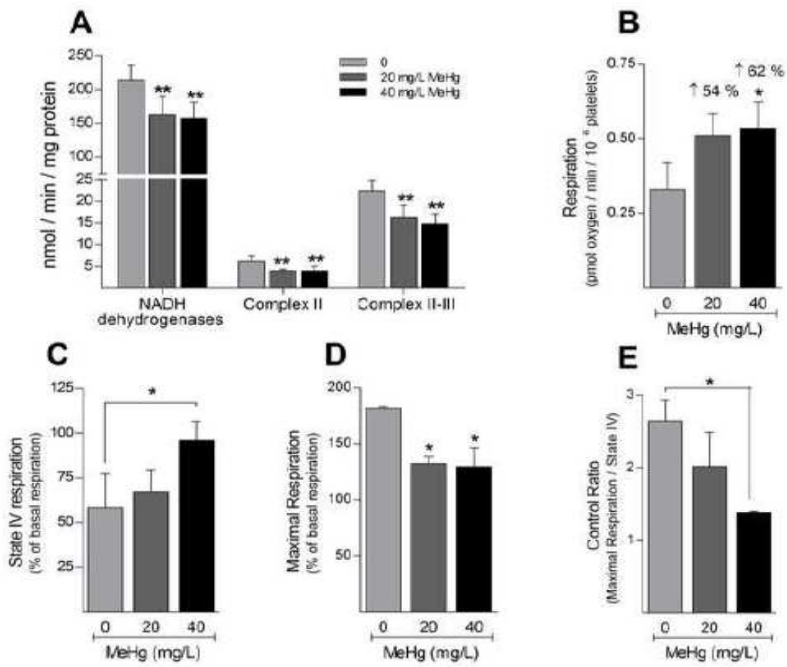


Figure 4

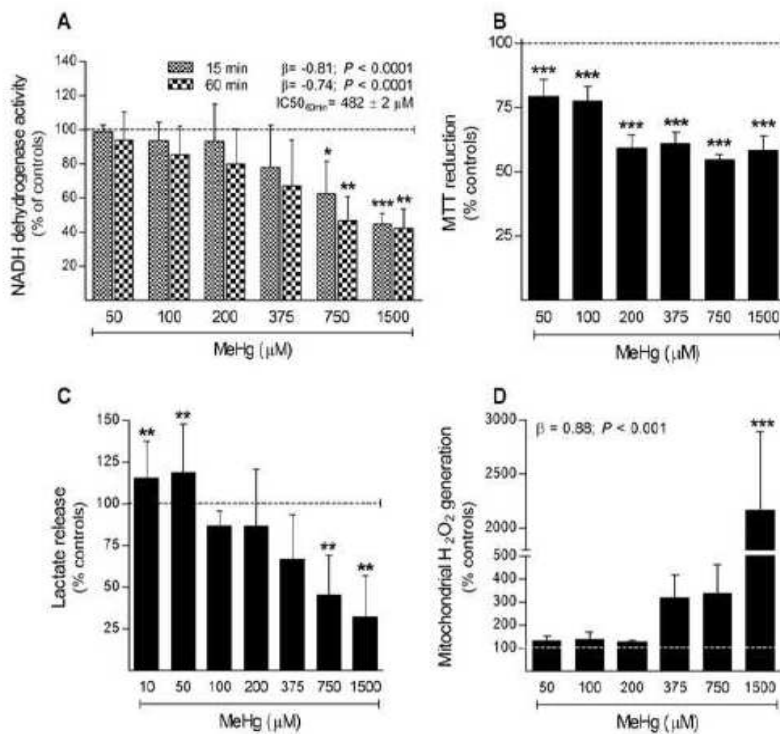


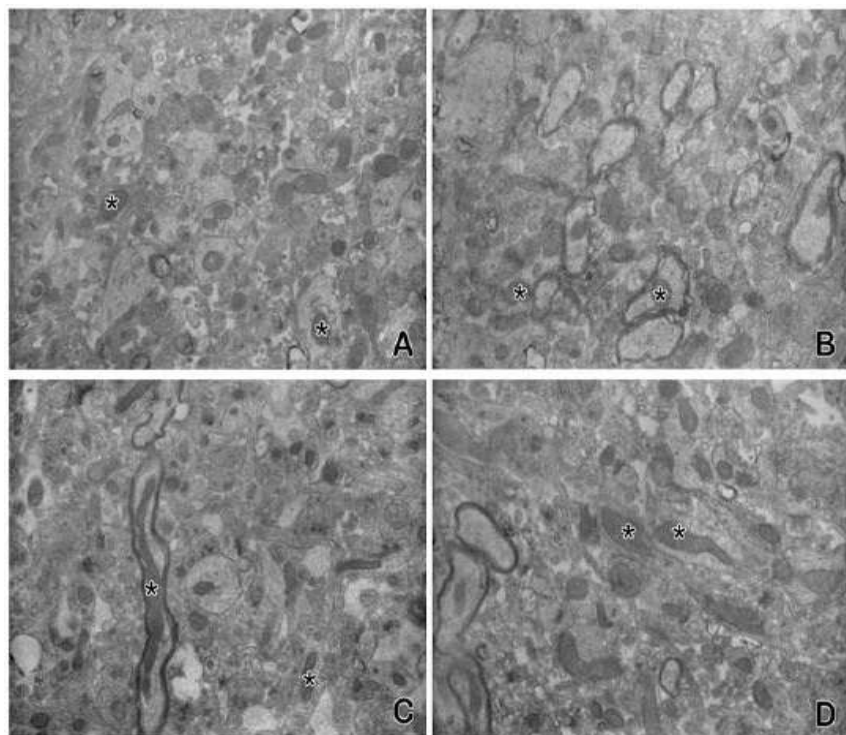
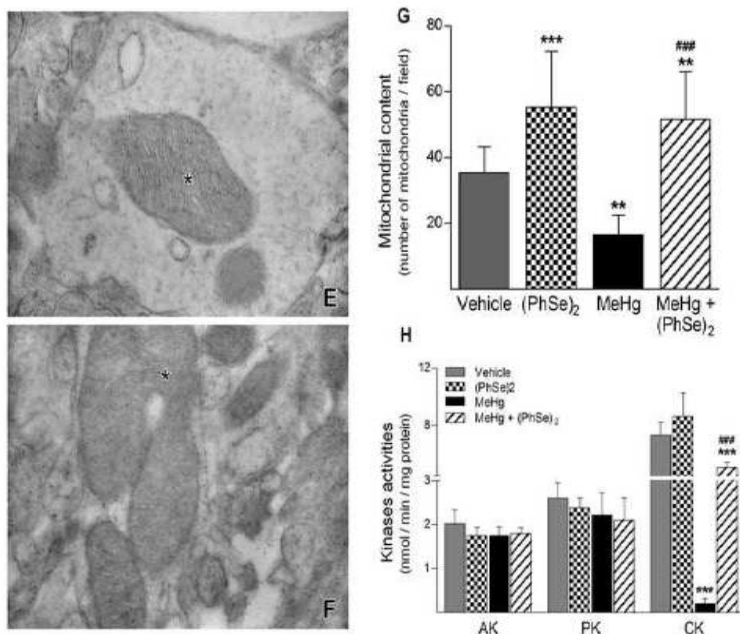
Figure 5 A-D

Figure 5 E-H

6 DISCUSSÃO

O dano neurológico causado pela intoxicação por MeHg está associado a degeneração da camada celular granular cerebelar e da região calcarina do córtex. Estas alterações neuropatológicas foram descritas tanto em humanos quanto em roedores (Hunter and Russell, 1954, Tsuchiya, 1969, Eto et al., 1999, Andreyev et al., 2005). Os principais mecanismos de toxicidade relacionados a estas alterações no SNC estão associados, principalmente, ao comprometimento da homeostase do cálcio intracelular (Sirois and Atchison, 2000), alterações na homeostase do glutamato e indução de estresse oxidativo (Aschner et al., 2007, Farina, 2011b). Nosso estudo traz evidências de que a contínua administração de MeHg por 21 dias prejudica o metabolismo energético central e sistêmico por alterar a morfologia e conteúdo de mitocôndrias do córtex cerebral, e por reduzir a atividade metabólica nesta organela no cérebro (córtex cerebral) e na periferia (plaquetas). Além disso, este prejuízo energético induzido pelo MeHg também provoca comprometimento cognitivo, visto que os animais intoxicados com o mercurial mostraram déficit na memória. Ainda, neste trabalho, foi demonstrado que os efeitos mitotóxicos do MeHg podem ser atenuados com a co-administração do composto de Se, (PhSe)₂.

Nosso grupo de pesquisa demonstrou previamente que o protocolo experimental de intoxicação com MeHg empregado neste trabalho, causa significativa neurotoxicidade evidenciado por alterações relacionadas com parâmetros comportamentais e bioquímicos (Farina et al., 2003, Dietrich et al., 2005, Franco et al., 2006, Franco et al., 2007b, de Freitas et al., 2009, Franco et al., 2009, Glaser et al., 2010b). O presente estudo adiciona novas informações sobre este protocolo experimental, mostrando que a administração oral e repetida de MeHg induz significantes alterações cognitivas caracterizadas por prejuízo na memória relacionado com o comprometimento do córtex cerebral (Figura 1A). Estes resultados estão de acordo com dados experimentais prévios mostrando que o MeHg induz comprometimento na memória de curto prazo e comportamentos dirigidos pela motivação em camundongos e ratos (Onishchenko et al., 2007, Maia Cdo et al., 2010). Além disso, o comportamento alterado está também de acordo com estudos epidemiológicos mostrando prejuízo cognitivo em humanos

expostos ao MeHg (Grandjean et al., 1997, Grandjean et al., 1998, Grandjean et al., 1999).

Segundo Murai e colaboradores (2007) o teste de memória de localização do objeto representa um modelo de memória espacial de tentativa, onde os animais podem aprender sem reforços ou recompensas, como comida, moldando o processo de aprendizagem. Além disso, este modelo tem a vantagem da preferência que os camundongos mostram por um objeto que foi movido de sua posição inicial (Ennaceur et al., 1997). Apesar do teste ser característico para avaliar o comprometimento hipocampal, por estar relacionado a aprendizagem espacial e reconhecimento de um objeto ou situação nova ou familiar (Assini et al., 2009), vários estudos também relatam o envolvimento de diferentes áreas do córtex cerebral. Sabe-se que o córtex pré-frontal medial é importante para a memória de trabalho espacial (Brozoski et al., 1979), e que lesões no córtex pré-límbico comprometem a performance no teste de localização do objeto (Nelson et al., 2011). O mesmo perfil no comportamento dos animais são obtidos se estes são submetidos a lesões no fórnix ou no córtex cingulado (Ennaceur et al., 1997). Assim, o prejuízo cognitivo na tarefa de localização do objeto pode envolver o comprometimento do córtex cerebral dos roedores expostos, visto que a exposição crônica ao MeHg pode levar a degeneração do córtex cerebral, com impacto sobre o córtex visual, em humanos e macaco *Rhesus* (Hunter, 1954). Neste cenário, a constrição do campo visual frequentemente observado em humanos intoxicados por MeHg seria o resultado da perda de neurônios do córtex visual (Bakir et al., 1973).

Sabe-se que o MeHg prejudica o estado redox celular por interagir com moléculas de baixo peso molecular (glutathiona, cisteína, etc) e com proteínas que contem grupos tióis, incluindo os complexos I, I-III e IV da cadeia respiratória e a creatina cinase mitocondrial (mtCK) como demonstrado aqui (Figuras 3A e 5G) e previamente pelo nosso grupo de pesquisa (Glaser et al., 2010a, Glaser et al., 2010b).

Existe um grande interesse pelo desenvolvimento de biomarcadores que possam fornecer sinais de alerta precoce da neurotoxicidade do mercurial, antes de considerável dano ao SNC. Entretanto, poucos relatos na literatura demonstram uma relação clara entre efeitos centrais e periféricos induzidos pelo toxicante que permitam tal identificação. A principal dificuldade encontrada pelos pesquisadores é a inacessibilidade ao tecido cerebral para amostragem,

entretanto, uma solução para esse problema, pareceria ser o uso de células sanguíneas periféricas, em particular de plaquetas. Neste contexto, tem-se utilizado, rotineiramente, plaquetas em estudos farmacológicos, como modelo de terminações nervosas, porque elas contêm e liberam neurotransmissores, além de conter receptores para neurotransmissores na sua superfície (Ally et al., 1993, Chakrabarti et al., 1998). Além disso, tem-se proposto que estes elementos sanguíneos podem servir como marcadores para mudanças na função mitocondrial ocorrida na senescência e doenças relacionadas à idade (Merlo Pich et al., 1996, Xu et al., 2007). Assim, neste trabalho, além de avaliar o metabolismo energético cerebral após a exposição repetida ao MeHg, foi também avaliada a respiração mitocondrial em plaquetas.

Os resultados deste trabalho estão de acordo com publicações prévias demonstrando que a exposição ao MeHg induz comprometimento do metabolismo energético caracterizado por redução na atividade da cadeia respiratória mitocondrial (Yoshino et al., 1966, Franco et al., 2007a, Glaser et al., 2010b). Além de corroborar esses resultados prévios com esquemas similares de administração de MeHg, este trabalho demonstra que essas alterações também acontecem no córtex cerebral (Figura 3A) e que existe comprometimento da respiração mitocondrial na periferia (plaquetas; Figura 3B-D). Ainda mais, foi demonstrado que estes efeitos bioquímicos centrais e periféricos correlacionam significativamente (Figura 2B-D). O aumento da respiração basal das plaquetas aponta para a maior demanda energética na fosforilação oxidativa mitocondrial (Figura 3B), provavelmente devido a desacoplamento mitocondrial, ou a baixa concentração celular de ATP. Isto também está de acordo com o aumento da respiração no estado IV (quando a oxidação de substratos respiratórios não está acoplada à síntese de ATP (uso de oligomicina na Figura 3C) observada em plaquetas de animais intoxicados, o que deve estar relacionado principalmente ao vazamento de prótons (Gnaiger, 2007). Adicionalmente, dois processos extensivamente demonstrados após exposição ao MeHg, a formação de EROs e a indução do poro de transição da permeabilidade mitocondrial, também podem contribuir para o consumo aumentado de oxigênio (Figura 4D) (Mori et al., 2007, Franco et al., 2009, Glaser et al., 2010a, Glaser et al., 2010b). A ativação do último mecanismo leva à perda de substratos da matriz mitocondrial bem como a dissipação da força próton-motriz, o que causa desacoplamento e inibição da respiração (Nicholls, 2004). A adição de

FCCP, um protonóforo, capaz de liberar prótons na matriz mitocondrial, dissipando o gradiente de prótons, também provoca inibição da respiração (Figura 3D) (Lehninger, 2004). A inibição do consumo de oxigênio pode ser relacionada à redução no conteúdo mitocondrial observado (Figura 3H) e/ou inibição dos complexos da cadeia respiratória (Figura 3A) em animais tratados com MeHg.

Vale ressaltar que o déficit de memória observado correlaciona-se significativamente com o aumento no consumo de oxigênio sistêmico, o que deve ser considerado como um marcador de disfunção do metabolismo mitocondrial (Figuras 2A e 3D). Além disso, as alterações na respiração sistêmica, induzidas por MeHg, também correlacionam com uma redução na função mitocondrial no córtex cerebral (Figura 2B-D), sugerindo que a alteração mitocondrial deve representar um importante marcador do comprometimento cognitivo induzido pelo MeHg. Portanto, é possível propor o uso da respiração plaquetária como um marcador periférico para prever a neurotoxicidade em indivíduos expostos ao MeHg, em adição à determinação da concentração de Hg sanguíneo. O uso deste achado sistêmico baseia-se no fato de doenças com neurodegeneração severa também apresentarem alterações bioenergéticas sistêmicas, por exemplo, na doença de Parkinson (PD), onde comprometimento energético cerebral – redução na atividade do complexo I da cadeia respiratória – tem sido constantemente observado em plaquetas de pacientes afetados (Krige et al., 1992, Mann et al., 1992).

A fim de compreender melhor os mecanismos envolvidos nas alterações energéticas cérebro-corticais induzidas pelo MeHg, preparações cerebrais foram expostas a concentrações crescentes do mercurial. Observou-se uma significativa inibição da atividade da NADH desidrogenase (complexo I), de maneira dose-dependente, após pequenos períodos de incubação com MeHg, indicando a alta suscetibilidade dessa enzima ao toxicante. Considerando que o complexo I é a enzima limitante na fosforilação oxidativa (Chinopoulos and Adam-Vizi, 2001), a atividade reduzida deste complexo pode ter um impacto direto no estado energético geral da célula. Assim, é possível que o comprometimento da ETC limite a produção de energia e promova estresse oxidativo, desempenhando um papel crítico na iniciação da deterioração neuronal, já que os resultados aqui apresentados mostraram estímulo da glicólise anaeróbia (concentrações menores de MeHg) e aumento na produção de H_2O_2 (Figura 4C-D).

Provavelmente, a indução de estresse oxidativo mitocondrial, pelo MeHg, em córtex, também provoque a inibição da atividade da CK. Neste contexto, estudos prévios apontam que esta enzima é essencial para manter o desenvolvimento e regulação de funções cerebrais, portanto, mudanças na sua atividade podem representar um ponto importante nos mecanismos tóxicos que levam a neurodegeneração (Tomimoto et al., 1993, Wendt et al., 2002, Glaser et al., 2010a, Glaser et al., 2010b). Além disso, o sítio ativo da CK contém um resíduo cisteinil que é crítico para a ligação do substrato (Kenyon, 1996). Consequentemente, esta enzima é altamente suscetível à inativação por reações oxidativas (Yuan et al., 1992).

Os efeitos do tratamento com MeHg e/ou (PhSe)₂ no perfil morfológico da mitocôndria representam uma novidade significativa neste estudo. De fato, embora alguns estudos mostrem que o MeHg é tóxico para a mitocôndria (Mori et al., 2007, Glaser et al., 2010b), este é o primeiro a mostrar que o número e perfil morfológico das mitocôndrias são alterados após a exposição ao mercurial (Figura 5A-G). Este resultado deve ser consequência da indução de estresse oxidativo e déficit energético observado em modelos experimentais de intoxicação por MeHg (Farina, 2011b). Como o número de mitocôndrias foi reduzido e a morfologia prevalente foi de mitocôndrias tubulares, pode-se propor que a intoxicação por MeHg induz a fusão mitocondrial. A fusão de mitocôndrias é um processo requerido para a troca de substratos metabólicos intramitocondrial e manutenção da capacidade respiratória (Skulachev, 2001). Portanto, sob situações de deficiência energética, a fusão mitocondrial permitiria misturar e unificar compartimentos mitocondriais, o que resultaria na complementação de DNA mitocondrial (mtDNA) e neutralização de deficiências respiratórias (Ono et al., 2001, Chen et al., 2010). Além disso, a fusão funciona como um mecanismo para o controle de qualidade mitocondrial já que previne a concentração local de proteínas mitocondriais defeituosas, por diluí-las através da rede mitocondrial. Reciprocamente, a redução anormal da fusão de mitocôndrias defeituosas resulta na exclusão de macromoléculas danificadas dentro de uma única unidade mitocondrial (Benard and Karbowski, 2009).

Este trabalho também forneceu informações sobre as propriedades mitogênicas do (PhSe)₂, as quais podem estar relacionadas aos efeitos benéficos contra condições patológicas relacionadas ao desbalanço energético, incluindo efeitos antioxidantes, anti-

inflamatórios, antinociceptivo, e antihipercolesterolêmico previamente descritos (Burger et al., 2006, de Bem et al., 2008, de Bem et al., 2009, de Freitas et al., 2009, de Freitas and Rocha, 2011, Hort et al., 2011, Nogueira and Rocha, 2011). O aumento no conteúdo mitocondrial em córtex cerebral de camundongos tratados com $(\text{PhSe})_2$ representa um achado intrigante deste estudo, mas os mecanismos relacionados a este evento ainda não foram elucidados; isto constitui um tópico muito interessante que merece pesquisas adicionais.

7 SUMÁRIO DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES

- A exposição oral e a longo prazo ao toxicante MeHg induz prejuízo cognitivo, assim como disfunção mitocondrial no córtex cerebral de camundongos, por reduzir a atividade dos complexos I,II e II-III da cadeia de transporte de elétrons e da mtCK;
- O MeHg inibe a atividade da NADH desidrogenase, além de induzir a produção de EROs (H_2O_2) e a glicólise anaeróbia, comprometendo a viabilidade celular *in vitro* em amostras de córtex cerebral de camundongos.
- Os efeitos comportamentais e no metabolismo energético cerebral de camundongos expostos a longo prazo ao MeHg correlacionam-se com alterações sistêmicas, como a diminuição no consumo de oxigênio em plaquetas, evidenciando comprometimento do funcionamento mitocondrial;
- A exposição oral e a longo prazo ao toxicante MeHg leva a redução no conteúdo e alterações na morfologia mitocondrial em córtex cerebral de camundongos, provavelmente por induzir o processo de fusão mitocondrial, o que pode ser prevenido pela coadministração de $(PhSe)_2$;
- O $(PhSe)_2$ *per se* modula a homeostase mitocondrial por aumentar o número de mitocôndrias em córtex cerebral de camundongos, o que pode estar relacionado com os efeitos benéficos previamente relatados.

8 CONCLUSÃO GERAL

A exposição oral e prolongada ao MeHg leva ao comprometimento cognitivo, assim como do metabolismo energético mitocondrial no tecido nervoso e sanguíneo. A coadministração de $(\text{PhSe})_2$ previne tais efeitos, além de induzir aumento no conteúdo mitocondrial quando administrado individualmente. A avaliação da função mitocondrial em plaquetas parece ser um biomarcador promissor para avaliar o grau de comprometimento do organismo intoxicado por MeHg.

9 PERSPECTIVAS

- Investigar o efeito da exposição ao MeHg sobre a expressão de genes relacionados com proteínas envolvidas no estresse oxidativo e bioenergética, como NDU-FA6 (subunidade da NADH desidrogenase da cadeia respiratória mitocondrial), citocromo oxidase (COX) I (complexo IV), TFAM, Nf- κ B e Nrf-2.
- Investigar o efeito da coadministração de (PhSe)₂ e MeHg no consumo de oxigênio em plaquetas e no prejuízo cognitivo;
- Investigar a expressão de genes de proteínas envolvidas nos processos de fusão e fissão mitocondrial em córtex cerebral de camundongos expostos ao MeHg e ao (PhSe)₂.
- Investigar os mecanismos moleculares envolvidos no aumento no conteúdo mitocondrial em córtex cerebral de camundongos tratados com (PhSe)₂.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adhihetty PJ, Beal MF (2008) Creatine and its potential therapeutic value for targeting cellular energy impairment in neurodegenerative diseases. *Neuromolecular Med* 10:275-290.
- Adhihetty PJ, Irrcher I, Joseph AM, Ljubicic V, Hood DA (2003) Plasticity of skeletal muscle mitochondria in response to contractile activity. *Exp Physiol* 88:99-107.
- Allan LA, Clarke PR (2009) Apoptosis and autophagy: Regulation of caspase-9 by phosphorylation. *FEBS J* 276:6063-6073.
- Allen JW, El-Oqayli H, Aschner M, Syversen T, Sonnewald U (2001a) Methylmercury has a selective effect on mitochondria in cultured astrocytes in the presence of [U-(13)C]glutamate. *Brain Res* 908:149-154.
- Allen JW, Shanker G, Aschner M (2001b) Methylmercury inhibits the in vitro uptake of the glutathione precursor, cystine, in astrocytes, but not in neurons. *Brain Res* 894:131-140.
- Ally A, Buist R, Mills P, Reuhl K (1993) Effects of methylmercury and trimethyltin on cardiac, platelet, and aorta eicosanoid biosynthesis and platelet serotonin release. *Pharmacol Biochem Behav* 44:555-563.
- Andersen O (2004) Chemical and biological considerations in the treatment of metal intoxications by chelating agents. *Mini Rev Med Chem* 4:11-21.
- Andres RH, Ducray AD, Schlattner U, Wallimann T, Widmer HR (2008) Functions and effects of creatine in the central nervous system. *Brain Res Bull* 76:329-343.
- Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA (2005) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)* 70:200-214.
- Andrienko T, Kuznetsov AV, Kaambre T, Usson Y, Orosco A, Appaix F, Tiivel T, Sikk P, Vendelin M, Margreiter R, Saks VA (2003) Metabolic consequences of functional complexes of mitochondria, myofibrils and sarcoplasmic reticulum in muscle cells. *J Exp Biol* 206:2059-2072.
- Aremu DAM, M. S.; Ballatori, N. (2008) N-Acetylcysteine as a Potential Antidote and Biomonitoring Agent of Methylmercury Exposure *Environmental Health Perspectives* 116.

- Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J (1989) The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 6:593-597.
- Aschner M (1996) Astrocytes as modulators of mercury-induced neurotoxicity. *Neurotoxicology* 17:663-669.
- Aschner M, Syversen T, Souza DO, Rocha JB, Farina M (2007) Involvement of glutamate and reactive oxygen species in methylmercury neurotoxicity. *Braz J Med Biol Res* 40:285-291.
- Assini FL, Duzzioni M, Takahashi RN (2009) Object location memory in mice: pharmacological validation and further evidence of hippocampal CA1 participation. *Behav Brain Res* 204:206-211.
- ATSDR (1999) Public Health Statement for Mercury. In: Agency for Toxic Substances and Disease Registry Atlanta, GA.
- Bakir F, Damluji SF, Amin-Zaki L, Murtadha M, Khalidi A, al-Rawi NY, Tikriti S, Dahahir HI, Clarkson TW, Smith JC, Doherty RA (1973) Methylmercury poisoning in Iraq. *Science* 181:230-241.
- Ballatori N, Lieberman MW, Wang W (1998) N-acetylcysteine as an antidote in methylmercury poisoning. *Environ Health Perspect* 106:267-271.
- Banner W, Jr., Koch M, Capin DM, Hopf SB, Chang S, Tong TG (1986) Experimental chelation therapy in chromium, lead, and boron intoxication with N-acetylcysteine and other compounds. *Toxicol Appl Pharmacol* 83:142-147.
- Barker JE, Heales SJ, Cassidy A, Bolanos JP, Land JM, Clark JB (1996) Depletion of brain glutathione results in a decrease of glutathione reductase activity; an enzyme susceptible to oxidative damage. *Brain Res* 716:118-122.
- Barrientos A, Barros MH, Valnot I, Rotig A, Rustin P, Tzagoloff A (2002) Cytochrome oxidase in health and disease. *Gene* 286:53-63.
- Beal MF (2005) Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann Neurol* 58:495-505.
- Belletti S, Orlandini G, Vettori MV, Mutti A, Uggeri J, Scandroglio R, Alinovi R, Gatti R (2002) Time course assessment of methylmercury effects on C6 glioma cells: submicromolar concentrations induce oxidative DNA damage and apoptosis. *J Neurosci Res* 70:703-711.

- Benard G, Karbowski M (2009) Mitochondrial fusion and division: Regulation and role in cell viability. *Semin Cell Dev Biol* 20:365-374.
- Bessman SP, Carpenter CL (1985) The creatine-creatine phosphate energy shuttle. *Annu Rev Biochem* 54:831-862.
- Beutner G, Ruck A, Riede B, Brdiczka D (1998) Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases. *Biochim Biophys Acta* 1368:7-18.
- Beutner G, Ruck A, Riede B, Welte W, Brdiczka D (1996) Complexes between kinases, mitochondrial porin and adenylate translocator in rat brain resemble the permeability transition pore. *FEBS Lett* 396:189-195.
- Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR (2002) Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev* 23:38-89.
- Bittl JA, Ingwall JS (1985) Reaction rates of creatine kinase and ATP synthesis in the isolated rat heart. A ^{31}P NMR magnetization transfer study. *J Biol Chem* 260:3512-3517.
- Bolanos JP, Almeida A (2010) The pentose-phosphate pathway in neuronal survival against nitrosative stress. *IUBMB Life* 62:14-18.
- Bolanos JP, Heales SJ, Peuchen S, Barker JE, Land JM, Clark JB (1996) Nitric oxide-mediated mitochondrial damage: a potential neuroprotective role for glutathione. *Free Radic Biol Med* 21:995-1001.
- Booyse FM, Hoveke TP, Rafelson ME, Jr. (1968) Studies on human platelets. II. Protein synthetic activity of various platelet populations. *Biochim Biophys Acta* 157:660-663.
- Borges LP, Borges VC, Moro AV, Nogueira CW, Rocha JB, Zeni G (2005) Protective effect of diphenyl diselenide on acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats. *Toxicology* 210:1-8.
- Borges LP, Nogueira CW, Panatieri RB, Rocha JB, Zeni G (2006) Acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats: effect of diphenyl diselenide on antioxidant defenses. *Chem Biol Interact* 160:99-107.

- Bragadin M, Marton D, Manente S, Grasso M, Toninello A (2002) Methylmercury induces the opening of the permeability transition pore in rat liver mitochondria. *J Inorg Biochem* 89:159-162.
- Branco V, Canario J, Holmgren A, Carvalho C (2011) Inhibition of the thioredoxin system in the brain and liver of zebra-seabreams exposed to waterborne methylmercury. *Toxicol Appl Pharmacol* 251:95-103.
- Brasil (1998) PRINCÍPIOS GERAIS PARA O ESTABELECIMENTO DE NÍVEIS MÁXIMOS DE CONTAMINANTES QUÍMICOS EM ALIMENTOS. In: 685, vol. Portaria 685 (Saúde, M. d., ed).
- Brookes N, Kristt DA (1989) Inhibition of amino acid transport and protein synthesis by HgCl_2 and methylmercury in astrocytes: selectivity and reversibility. *J Neurochem* 53:1228-1237.
- Brooks SP, Suelter CH (1987) Compartmented coupling of chicken heart mitochondrial creatine kinase to the nucleotide translocase requires the outer mitochondrial membrane. *Arch Biochem Biophys* 257:144-153.
- Brozoski TJ, Brown RM, Rosvold HE, Goldman PS (1979) Cognitive deficit caused by regional depletion of dopamine in prefrontal cortex of rhesus monkey. *Science* 205:929-932.
- Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X (1999) Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:269-290.
- Burbacher TM, Grant KS, Mayfield DB, Gilbert SG, Rice DC (2005) Prenatal methylmercury exposure affects spatial vision in adult monkeys. *Toxicol Appl Pharmacol* 208:21-28.
- Burger M, Fachinetto R, Calegari L, Paixao MW, Braga AL, Rocha JB (2004) Effects of age on reserpine-induced orofacial dyskinesia and possible protection of diphenyl diselenide. *Brain Res Bull* 64:339-345.
- Burger ME, Fachinetto R, Wagner C, Perottoni J, Pereira RP, Zeni G, Rocha JB (2006) Effects of diphenyl-diselenide on orofacial dyskinesia model in rats. *Brain Res Bull* 70:165-170.
- Cadenas E, Davies KJ (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 29:222-230.
- Carvalho CM, Lu J, Zhang X, Arner ES, Holmgren A (2010) Effects of selenite and chelating agents on mammalian thioredoxin

- reductase inhibited by mercury: implications for treatment of mercury poisoning. *FASEB J* 25:370-381.
- Carvalho MC, Franco JL, Ghizoni H, Kobus K, Nazari EM, Rocha JB, Nogueira CW, Dafre AL, Muller YM, Farina M (2007) Effects of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) on methylmercury-induced locomotor deficits and cerebellar toxicity in mice. *Toxicology* 239:195-203.
- Carvalho MC, Nazari EM, Farina M, Muller YM (2008) Behavioral, morphological, and biochemical changes after in ovo exposure to methylmercury in chicks. *Toxicol Sci* 106:180-185.
- Castoldi AF, Coccini T, Ceccatelli S, Manzo L (2001) Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury. *Brain Res Bull* 55:197-203.
- Cernichiari E, Myers GJ, Ballatori N, Zareba G, Vyas J, Clarkson T (2007) The biological monitoring of prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicology* 28:1015-1022.
- Chakrabarti SK, Loua KM, Bai C, Durham H, Panisset JC (1998) Modulation of monoamine oxidase activity in different brain regions and platelets following exposure of rats to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol* 20:161-168.
- Charleston JS, Body RL, Bolender RP, Mottet NK, Vahter ME, Burbacher TM (1996) Changes in the number of astrocytes and microglia in the thalamus of the monkey *Macaca fascicularis* following long-term subclinical methylmercury exposure. *Neurotoxicology* 17:127-138.
- Chen H, Vermulst M, Wang YE, Chomyn A, Prolla TA, McCaffery JM, Chan DC (2010) Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell* 141:280-289.
- Chernyak B (1965) Processes of formation and utilization of energy in human platelets. *Clin Chim Acta* 12:244-257.
- Chinopoulos C, Adam-Vizi V (2001) Mitochondria deficient in complex I activity are depolarized by hydrogen peroxide in nerve terminals: relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem* 76:302-306.
- Choi BH (1989) The effects of methylmercury on the developing brain. *Prog Neurobiol* 32:447-470.
- Clarkson TW (1993) Molecular and ionic mimicry of toxic metals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 33:545-571.

- Clarkson TW (1997) The toxicology of mercury. *Crit Rev Clin Lab Sci* 34:369-403.
- Clarkson TW (2002) The three modern faces of mercury. *Environ Health Perspect* 110 Suppl 1:11-23.
- Clarkson TW, Magos L (2006) The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Crit Rev Toxicol* 36:609-662.
- Clarkson TW, Magos L, Myers GJ (2003) The toxicology of mercury--current exposures and clinical manifestations. *N Engl J Med* 349:1731-1737.
- Costa MFB, M.; Silva, O. C. A. (2004) Anais do IV International Congress on the Biology of Fish. Manaus.
- Dave V, Mullaney KJ, Goderie S, Kimelberg HK, Aschner M (1994) Astrocytes as mediators of methylmercury neurotoxicity: effects on D-aspartate and serotonin uptake. *Dev Neurosci* 16:222-231.
- de Bem AF, de Lima Portella R, Farina M, Perottoni J, Paixao MW, Nogueira CW, Teixeira Rocha JB (2007) Low toxicity of diphenyl diselenide in rabbits: a long-term study. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 101:47-55.
- de Bem AF, Farina M, Portella Rde L, Nogueira CW, Dinis TC, Laranjinha JA, Almeida LM, Rocha JB (2008) Diphenyl diselenide, a simple glutathione peroxidase mimetic, inhibits human LDL oxidation in vitro. *Atherosclerosis* 201:92-100.
- de Bem AF, Portella Rde L, Colpo E, Duarte MM, Frediane A, Taube PS, Nogueira CW, Farina M, da Silva EL, Teixeira Rocha JB (2009) Diphenyl diselenide decreases serum levels of total cholesterol and tissue oxidative stress in cholesterol-fed rabbits. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 105:17-23.
- de Freitas AS, Funck VR, Rotta Mdos S, Bohrer D, Morschbacher V, Puntel RL, Nogueira CW, Farina M, Aschner M, Rocha JB (2009) Diphenyl diselenide, a simple organoselenium compound, decreases methylmercury-induced cerebral, hepatic and renal oxidative stress and mercury deposition in adult mice. *Brain Res Bull* 79:77-84.
- de Freitas AS, Rocha JB (2011) Diphenyl diselenide and analogs are substrates of cerebral rat thioredoxin reductase: a pathway for their neuroprotective effects. *Neurosci Lett* 503:1-5.

- Di Donato S (2000) Disorders related to mitochondrial membranes: pathology of the respiratory chain and neurodegeneration. *J Inher Metab Dis* 23:247-263.
- Dickinson CJ (1996) Cerebral oxidative metabolism in hypertension. *Clin Sci (Lond)* 91:539-550.
- Dietrich MO, Mantese CE, dos Anjos G, Souza DO, Farina M (2005) Motor impairment induced by oral exposure to methylmercury in adult mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 19:169-175.
- Dixon M, Webb, E.C. (1964) *Enzymes*. London: Longmans.
- Dolder M, Walzel B, Speer O, Schlattner U, Wallimann T (2003) Inhibition of the mitochondrial permeability transition by creatine kinase substrates. Requirement for microcompartmentation. *J Biol Chem* 278:17760-17766.
- Droge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47-95.
- Ennaceur A, Neave N, Aggleton JP (1997) Spontaneous object recognition and object location memory in rats: the effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. *Exp Brain Res* 113:509-519.
- Eppenberger ME, Eppenberger HM, Kaplan NO (1967) Evolution of creatine kinase. *Nature* 214:239-241.
- Erecinska M, Nelson D, Yudkoff M, Silver IA (1994) Energetics of the nerve terminal in relation to central nervous system function. *Biochem Soc Trans* 22:959-965.
- Eto K, Takizawa Y, Akagi H, Haraguchi K, Asano S, Takahata N, Tokunaga H (1999) Differential diagnosis between organic and inorganic mercury poisoning in human cases--the pathologic point of view. *Toxicol Pathol* 27:664-671.
- Farina M, Brandao R, Lara FS, Soares FA, Souza DO, Rocha JB (2003) Mechanisms of the inhibitory effects of selenium and mercury on the activity of delta-aminolevulinic acid dehydratase from mouse liver, kidney and brain. *Toxicol Lett* 139:55-66.
- Farina M, Franco JL, Ribas CM, Meotti FC, Missau FC, Pizzolatti MG, Dafre AL, Santos AR (2005) Protective effects of *Polygala paniculata* extract against methylmercury-induced neurotoxicity in mice. *J Pharm Pharmacol* 57:1503-1508.

- Farina M, Rocha JB, Aschner M (2011) Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: evidence from experimental studies. *Life Sci* 89:555-563.
- Farina M, Rocha, J.B.T., Aschner, M. (2011a) OXIDATIVE STRESS AND METHYLMERCURY-INDUCED NEUROTOXICITY. In: *Developmental Neurotoxicology Research: Principles, Models, Techniques, Strategies and Mechanisms* (Cheng Wang, W. S., ed).
- Farina MA, M.; Rocha, J.B.T. (2011b) Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 256:405-417.
- Ferguson D, Sapolsky R (2007) Mineralocorticoid receptor overexpression differentially modulates specific phases of spatial and nonspatial memory. *J Neurosci* 27:8046-8052.
- Fernandez-Checa JC (2003) Redox regulation and signaling lipids in mitochondrial apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 304:471-479.
- Ferraro L, Tomasini MC, Tanganelli S, Mazza R, Coluccia A, Carratu MR, Gaetani S, Cuomo V, Antonelli T (2009) Developmental exposure to methylmercury elicits early cell death in the cerebral cortex and long-term memory deficits in the rat. *Int J Dev Neurosci* 27:165-174.
- Fiskum G, Murphy AN, Beal MF (1999) Mitochondria in neurodegeneration: acute ischemia and chronic neurodegenerative diseases. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:351-369.
- Fonfria E, Vilaro MT, Babot Z, Rodriguez-Farre E, Sunol C (2005) Mercury compounds disrupt neuronal glutamate transport in cultured mouse cerebellar granule cells. *J Neurosci Res* 79:545-553.
- Franco JL, Braga HC, Stringari J, Missau FC, Posser T, Mendes BG, Leal RB, Santos AR, Dafre AL, Pizzolatti MG, Farina M (2007a) Mercurial-induced hydrogen peroxide generation in mouse brain mitochondria: protective effects of quercetin. *Chem Res Toxicol* 20:1919-1926.
- Franco JL, Braga Hde C, Nunes AK, Ribas CM, Stringari J, Silva AP, Garcia Pomblum SC, Moro AM, Bohrer D, Santos AR, Dafre AL, Farina M (2007b) Lactational exposure to inorganic mercury: evidence of neurotoxic effects. *Neurotoxicol Teratol* 29:360-367.

- Franco JL, Posser T, Dunkley PR, Dickson PW, Mattos JJ, Martins R, Bairy AC, Marques MR, Dafre AL, Farina M (2009) Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. *Free Radic Biol Med* 47:449-457.
- Franco JL, Teixeira A, Meotti FC, Ribas CM, Stringari J, Garcia Pomblum SC, Moro AM, Bohrer D, Bairo AV, Dafre AL, Santos AR, Farina M (2006) Cerebellar thiol status and motor deficit after lactational exposure to methylmercury. *Environ Res* 102:22-28.
- Frankenberg L (1979) Cardiac puncture in the mouse through the anterior thoracic aperture. *Lab Anim* 13:311-312.
- Fulda SG, L.; Kroemer, G. (2010) Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery* 9:447-464.
- Ganther HE, Goudie C, Sunde ML, Kopecky MJ, Wagner P (1972) Selenium: relation to decreased toxicity of methylmercury added to diets containing tuna. *Science* 175:1122-1124.
- Garman RH, Weiss B, Evans HL (1975) Alkylmercurial encephalopathy in the monkey (*Saimiri sciureus* and *Macaca arctoides*): a histopathologic and autoradiographic study. *Acta Neuropathol* 32:61-74.
- Ghisleni G, Porciuncula LO, Cimarosti H, Batista TRJ, Salbego CG, Souza DO (2003) Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immunocontent. *Brain Res* 986:196-199.
- Gilbert SG, Grant-Webster KS (1995) Neurobehavioral effects of developmental methylmercury exposure. *Environ Health Perspect* 103 Suppl 6:135-142.
- Glaser V, Leipnitz G, Straliootto MR, Oliveira J, dos Santos VV, Wannmacher CM, de Bem AF, Rocha JB, Farina M, Latini A (2010a) Oxidative stress-mediated inhibition of brain creatine kinase activity by methylmercury. *Neurotoxicology* 31:454-460.
- Glaser V, Nazari EM, Muller YM, Feksa L, Wannmacher CM, Rocha JB, de Bem AF, Farina M, Latini A (2010b) Effects of inorganic selenium administration in methylmercury-induced neurotoxicity in mouse cerebral cortex. *Int J Dev Neurosci* 28:631-637.

- Gnaiger E (2007) Mitochondrial Pathways and Respiratory Control. Innsbruck: OROBOROS MiPNet Publications.
- Grandjean P, Budtz-Jorgensen E, White RF, Jorgensen PJ, Weihe P, Debes F, Keiding N (1999) Methylmercury exposure biomarkers as indicators of neurotoxicity in children aged 7 years. *Am J Epidemiol* 150:301-305.
- Grandjean P, Herz KT (2011) Methylmercury and brain development: imprecision and underestimation of developmental neurotoxicity in humans. *Mt Sinai J Med* 78:107-118.
- Grandjean P, Weihe P, White RF, Debes F (1998) Cognitive performance of children prenatally exposed to "safe" levels of methylmercury. *Environ Res* 77:165-172.
- Grandjean P, Weihe P, White RF, Debes F, Araki S, Yokoyama K, Murata K, Sorensen N, Dahl R, Jorgensen PJ (1997) Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol* 19:417-428.
- Halliwell B (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 97:1634-1658.
- Harada M (1995) Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Crit Rev Toxicol* 25:1-24.
- Hintelmann H (2010) Organomercurials. Their formation and pathways in the environment. *Met Ions Life Sci* 7:365-401.
- Hort MA, Straliootto MR, Netto PM, da Rocha JB, de Bem AF, Ribeiro-do-Valle RM (2011) Diphenyl diselenide effectively reduces atherosclerotic lesions in LDLr ^{-/-} mice by attenuation of oxidative stress and inflammation. *J Cardiovasc Pharmacol* 58:91-101.
- Hunter D, Russell DS (1954) Focal cerebellar and cerebellar atrophy in a human subject due to organic mercury compounds. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 17:235-241.
- Inouye M, Kajiwara Y, Hirayama K (1986) Dose- and sex-dependent alterations in mercury distribution in fetal mice following methylmercury exposure. *J Toxicol Environ Health* 19:425-435.
- Jacobs H, Heldt HW, Klingenberg M (1964) High activity of creatine kinase in mitochondria from muscle and brain and evidence for a separate mitochondrial isoenzyme of creatine kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 16:516-521.

- James AM, Smith RA, Murphy MP (2004) Antioxidant and prooxidant properties of mitochondrial Coenzyme Q. *Arch Biochem Biophys* 423:47-56.
- Jezek PH, L. (2005) Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37:2478-2503.
- Johansson C, Castoldi AF, Onishchenko N, Manzo L, Vahter M, Ceccatelli S (2007) Neurobehavioural and molecular changes induced by methylmercury exposure during development. *Neurotox Res* 11:241-260.
- Kenyon GL (1996) Energy metabolism. Creatine kinase shapes up. *Nature* 381:281-282.
- Kojo S (2004) Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr Med Chem* 11:1041-1064.
- Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* 416:15-18.
- Krige D, Carroll MT, Cooper JM, Marsden CD, Schapira AH (1992) Platelet mitochondrial function in Parkinson's disease. The Royal Kings and Queens Parkinson Disease Research Group. *Ann Neurol* 32:782-788.
- Kunz D, Luley C, Fritz S, Bohnensack R, Winkler K, Kunz WS, Wallesch CW (1995) Oxygraphic evaluation of mitochondrial function in digitonin-permeabilized mononuclear cells and cultured skin fibroblasts of patients with chronic progressive external ophthalmoplegia. *Biochem Mol Med* 54:105-111.
- Latini A, da Silva CG, Ferreira GC, Schuck PF, Scussiato K, Sarkis JJ, Dutra Filho CS, Wyse AT, Wannmacher CM, Wajner M (2005a) Mitochondrial energy metabolism is markedly impaired by D-2-hydroxyglutaric acid in rat tissues. *Mol Genet Metab* 86:188-199.
- Latini A, Rodriguez M, Borba Rosa R, Scussiato K, Leipnitz G, Reis de Assis D, da Costa Ferreira G, Funchal C, Jacques-Silva MC, Buzin L, Giugliani R, Cassina A, Radi R, Wajner M (2005b) 3-Hydroxyglutaric acid moderately impairs energy metabolism in brain of young rats. *Neuroscience* 135:111-120.
- Lee YJ, Jeong SY, Karbowski M, Smith CL, Youle RJ (2004) Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators

- Fis1, Drp1, and Op18 in apoptosis. *Mol Biol Cell* 15:5001-5011.
- Lehninger A, Nelson D, Cox MM (2004) *Principles of Biochemistry*. 698.
- Leyshon-Sorland K, Jasani B, Morgan AJ (1994) The localization of mercury and metallothionein in the cerebellum of rats experimentally exposed to methylmercury. *Histochem J* 26:161-169.
- Li F, Srinivasan A, Wang Y, Armstrong RC, Tomaselli KJ, Fritz LC (1997) Cell-specific induction of apoptosis by microinjection of cytochrome c. Bcl-xL has activity independent of cytochrome c release. *J Biol Chem* 272:30299-30305.
- Limke TL, Atchison WD (2002) Acute exposure to methylmercury opens the mitochondrial permeability transition pore in rat cerebellar granule cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 178:52-61.
- Lin MT, Beal MF (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443:787-795.
- Lucena GM, Franco JL, Ribas CM, Azevedo MS, Meotti FC, Gadotti VM, Dafre AL, Santos AR, Farina M (2007) *Cipura paludosa* extract prevents methyl mercury-induced neurotoxicity in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 101:127-131.
- Luchese C, Brandao R, de Oliveira R, Nogueira CW, Santos FW (2007a) Efficacy of diphenyl diselenide against cerebral and pulmonary damage induced by cadmium in mice. *Toxicol Lett* 173:181-190.
- Luchese C, Stangherlin EC, Ardais AP, Nogueira CW, Santos FW (2007b) Diphenyl diselenide prevents oxidative damage induced by cigarette smoke exposure in lung of rat pups. *Toxicology* 230:189-196.
- MacAskill AF, Kittler JT (2010) Control of mitochondrial transport and localization in neurons. *Trends Cell Biol* 20:102-112.
- Maia Cdo S, Ferreira VM, Diniz JS, Carneiro FP, de Sousa JB, da Costa ET, Tomaz C (2010) Inhibitory avoidance acquisition in adult rats exposed to a combination of ethanol and methylmercury during central nervous system development. *Behav Brain Res* 211:191-197.
- Manfroi CB, Schwalm FD, Cereser V, Abreu F, Oliveira A, Bizarro L, Rocha JB, Frizzo ME, Souza DO, Farina M (2004) Maternal milk as methylmercury source for suckling mice: neurotoxic

- effects involved with the cerebellar glutamatergic system. *Toxicol Sci* 81:172-178.
- Mann KV, Travers JD (1991) Succimer, an oral lead chelator. *Clin Pharm* 10:914-922.
- Mann VM, Cooper JM, Krige D, Daniel SE, Schapira AH, Marsden CD (1992) Brain, skeletal muscle and platelet homogenate mitochondrial function in Parkinson's disease. *Brain* 115 (Pt 2):333-342.
- Marks DB, Marks AD, Smith CM (1996) *Basic Medical Biochemistry: a clinical approach*.
- Marks DB, Marks, A.D., Smith, C.M. (1996) *Basic Medical Biochemistry: a clinical approach*.
- Marsh DO, Turner MD, Smith JC, Allen P, Richdale N (1995) Fetal methylmercury study in a Peruvian fish-eating population. *Neurotoxicology* 16:717-726.
- Meotti FC, Stangherlin, E. C., Zeni, G., Nogueira, C. W., and Rocha, J. B. T. (2004) Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. *Environ Res* 94:276-282.
- Merlo Pich M, Bovina C, Formiggini G, Cometti GG, Ghelli A, Parenti Castelli G, Genova ML, Marchetti M, Semeraro S, Lenaz G (1996) Inhibitor sensitivity of respiratory complex I in human platelets: a possible biomarker of ageing. *FEBS Lett* 380:176-178.
- Moldeus P, Cotgreave IA, Berggren M (1986) Lung protection by a thiol-containing antioxidant: N-acetylcysteine. *Respiration* 50 Suppl 1:31-42.
- Molloy GR, Wilson CD, Benfield P, de Vellis J, Kumar S (1992) Rat brain creatine kinase messenger RNA levels are high in primary cultures of brain astrocytes and oligodendrocytes and low in neurons. *J Neurochem* 59:1925-1932.
- Mori N, Yasutake A, Hirayama K (2007) Comparative study of activities in reactive oxygen species production/defense system in mitochondria of rat brain and liver, and their susceptibility to methylmercury toxicity. *Arch Toxicol* 81:769-776.
- Muller FLL, Y.; Remmen. H. van (2004) Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *Journal of Biological Chemistry* 279:49064-49073.

- Murai T, Okuda S, Tanaka T, Ohta H (2007) Characteristics of object location memory in mice: Behavioral and pharmacological studies. *Physiol Behav* 90:116-124.
- Myers GJ, Davidson PW (2000) Does methylmercury have a role in causing developmental disabilities in children? *Environ Health Perspect* 108 Suppl 3:413-420.
- Nelson AJ, Cooper MT, Thur KE, Marsden CA, Cassaday HJ (2011) The effect of catecholaminergic depletion within the prelimbic and infralimbic medial prefrontal cortex on recognition memory for recency, location, and objects. *Behav Neurosci* 125:396-403.
- Nicholls DG (2004) Mitochondrial membrane potential and aging. *Aging Cell* 3:35-40.
- Nicholls DG, Budd SL (2000) Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev* 80:315-360.
- Nielsen JB, Andersen O (1992) The toxicokinetics of mercury in mice offspring after maternal exposure to methylmercury--effect of selenomethionine. *Toxicology* 74:233-241.
- Nogueira CW, Meotti, F. C., Curte, E., Pilissão, C., Zeni, G., and Rocha, J. B. (2003) Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. *Toxicology* 183 183:29-37.
- Nogueira CW, Quinhones EB, Jung EA, Zeni G, Rocha JB (2003a) Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. *Inflamm Res* 52:56-63.
- Nogueira CW, Rocha JB Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. *Arch Toxicol* 85:1313-1359.
- Nogueira CW, Rocha JB (2011) Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. *Arch Toxicol* 85:1313-1359.
- Nogueira CW, Soares FA, Nascimento PC, Muller D, Rocha JB (2003b) 2,3-Dimercaptopropane-1-sulfonic acid and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid increase mercury- and cadmium-induced inhibition of delta-aminolevulinic acid dehydratase. *Toxicology* 184:85-95.
- Nogueira CW, Zeni G, Rocha JB (2004) Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem Rev* 104:6255-6285.

- Nunnari J, Marshall, W.F., Straight, A., Murray, A., Sedat, J.W., Walter, P. (1997) Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol Biol Cell* 8:1233–1242.
- Okado-Matsumoto A, Fridovich I (2001) Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem* 276:38388-38393.
- Olivares IRB (2003) Emissões antrópicas de mercúrio para atmosfera na região de Paulínia/SP., vol. Mestrado Campinas/SP: Universidade Estadual de Campinas.
- Onishchenko N, Tamm C, Vahter M, Hokfelt T, Johnson JA, Johnson DA, Ceccatelli S (2007) Developmental exposure to methylmercury alters learning and induces depression-like behavior in male mice. *Toxicol Sci* 97:428-437.
- Ono T, Isobe K, Nakada K, Hayashi JI (2001) Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria. *Nat Genet* 28:272-275.
- Panee J, Stoytcheva ZR, Liu W, Berry MJ (2007) Selenoprotein H is a redox-sensing high mobility group family DNA-binding protein that up-regulates genes involved in glutathione synthesis and phase II detoxification. *J Biol Chem* 282:23759-23765.
- Parizek J, Ostadalova I (1967) The protective effect of small amounts of selenite in sublimate intoxication. *Experientia* 23:142-143.
- Paulmier C (1986) Selenoorganic functional groups. In: *Selenium Reagents and Intermediates in Organic Synthesis* (Paulmier, C., ed), pp 25-51 Oxford, England: Pergamon Press.
- Pich MM, Bovina, C., Formigginia, G., Cometti, G.G., Ghellic, A., Castelli, G.P., Genova, M.L., Marchetti, M., Semeraro, S., Lenaz, G. (1996) Inhibitor sensitivity of respiratory complex I in human platelets: A possible biomarker of ageing. *FEBS Letters* 380:176-178.
- Pinheiro MCN, Nascimento, J.L.M., Silveira, L.C.L., Rocha, J.B.T., Aschner, M. (2009) Mercury and Selenium - A Review on Aspects Related to the Health of Human Populations in the Amazon. *Environmental Bioindicators* 4:222 — 245.
- Poli G, Schaur RJ (2000) 4-Hydroxynonenal in the pathomechanisms of oxidative stress. *IUBMB Life* 50:315-321.

- Posser T, Franco JL, dos Santos DA, Rigon AP, Farina M, Dafre AL, Teixeira Rocha JB, Leal RB (2008) Diphenyl diselenide confers neuroprotection against hydrogen peroxide toxicity in hippocampal slices. *Brain Res* 1199:138-147.
- Posser T, Moretto MB, Dafre AL, Farina M, da Rocha JB, Nogueira CW, Zeni G, Ferreira Jdos S, Leal RB, Franco JL (2006) Antioxidant effect of diphenyl diselenide against sodium nitroprusside (SNP) induced lipid peroxidation in human platelets and erythrocyte membranes: an in vitro evaluation. *Chem Biol Interact* 164:126-135.
- Poyton RO, McEwen JE (1996) Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. *Annu Rev Biochem* 65:563-607.
- Radi R, Cassina A, Hodara R (2002) Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biol Chem* 383:401-409.
- Raymond LJR, N.V.C. (2004) Observations on the level of total Hg and Se in species common to the fisheries of Seychelles. *J Seychelles Med Dent* 7:56-60.
- Reznick AZP, L. (1993) Free radicals and antioxidants in muscular neurological diseases and disorders. In: *Free radicals: from basic science to medicine*(Poli, G., Albano, E., Dianzani, M.U., ed), pp 425-437 Birkhauser Verlag: Basel.
- Rice D, Barone S, Jr. (2000) Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect* 108 Suppl 3:511-533.
- Risher JF, Amler SN (2005) Mercury exposure: evaluation and intervention the inappropriate use of chelating agents in the diagnosis and treatment of putative mercury poisoning. *Neurotoxicology* 26:691-699.
- Rush T, Hjelmhaug J, Lobner D (2009) Effects of chelators on mercury, iron, and lead neurotoxicity in cortical culture. *Neurotoxicology* 30:47-51.
- Saito Y, Hayashi T, Tanaka A, Watanabe Y, Suzuki M, Saito E, Takahashi K (1999) Selenoprotein P in human plasma as an extracellular phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Isolation and enzymatic characterization of human selenoprotein p. *J Biol Chem* 274:2866-2871.
- Saks VA, Khuchua ZA, Kuznetsov AV, Veksler VI, Sharov VG (1986) Heart mitochondria in physiological salt solution: not ionic strength but salt composition is important for association of

- creatine kinase with the inner membrane surface. *Biochem Biophys Res Commun* 139:1262-1271.
- Saks VA, Tiivel T, Kay L, Novel-Chate V, Daneshrad Z, Rossi A, Fontaine E, Keriél C, Leverve X, Ventura-Clapier R, Anflous K, Samuel JL, Rappaport L (1996a) On the regulation of cellular energetics in health and disease. *Mol Cell Biochem* 160-161:195-208.
- Saks VA, Ventura-Clapier R, Aliev MK (1996b) Metabolic control and metabolic capacity: two aspects of creatine kinase functioning in the cells. *Biochim Biophys Acta* 1274:81-88.
- Sanfeliu C, Sebastia J, Cristofol R, Rodriguez-Farre E (2003) Neurotoxicity of organomercurial compounds. *Neurotox Res* 5:283-305.
- Santiago AP, Chaves EA, Oliveira MF, Galina A (2008) Reactive oxygen species generation is modulated by mitochondrial kinases: correlation with mitochondrial antioxidant peroxidases in rat tissues. *Biochimie* 90:1566-1577.
- Saraste M (1990) Structural features of cytochrome oxidase. *Q Rev Biophys* 23:331-366.
- Schlattner U, Forstner M, Eder M, Stachowiak O, Fritz-Wolf K, Wallimann T (1998) Functional aspects of the X-ray structure of mitochondrial creatine kinase: a molecular physiology approach. *Mol Cell Biochem* 184:125-140.
- Shanker G, Allen JW, Mutkus LA, Aschner M (2001) Methylmercury inhibits cysteine uptake in cultured primary astrocytes, but not in neurons. *Brain Res* 914:159-165.
- Shanker G, Aschner M (2001) Identification and characterization of uptake systems for cystine and cysteine in cultured astrocytes and neurons: evidence for methylmercury-targeted disruption of astrocyte transport. *J Neurosci Res* 66:998-1002.
- Shanker G, Syversen T, Aschner M (2003) Astrocyte-mediated methylmercury neurotoxicity. *Biol Trace Elem Res* 95:1-10.
- Shaw JM, Nunnari, J. (2002) Mitochondrial dynamics and division in budding yeast. *Trends Cell Biol* 12:178-184.
- Shenker BJ, Pankoski L, Zekavat A, Shapiro IM (2002) Mercury-induced apoptosis in human lymphocytes: caspase activation is linked to redox status. *Antioxid Redox Signal* 4:379-389.
- Sipos I, Tretter L, Adam-Vizi V (2003) The production of reactive oxygen species in intact isolated nerve terminals is independent

- of the mitochondrial membrane potential. *Neurochem Res* 28:1575-1581.
- Sirois JE, Atchison WD (2000) Methylmercury affects multiple subtypes of calcium channels in rat cerebellar granule cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 167:1-11.
- Sjovall F, Morota S, Hansson MJ, Friberg H, Gnaiger E, Elmer E (2010) Temporal increase of platelet mitochondrial respiration is negatively associated with clinical outcome in patients with sepsis. *Crit Care* 14:R214.
- Skerfving S (1974) Methylmercury exposure, mercury levels in blood and hair, and health status in Swedes consuming contaminated fish. *Toxicology* 2:3-23.
- Skerfving S (1978) Interaction between selenium and methylmercury. *Environ Health Perspect* 25:57-65.
- Skulachev VP (2001) Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends Biochem Sci* 26:23-29.
- Spurgeon A (2006) Prenatal methylmercury exposure and developmental outcomes: review of the evidence and discussion of future directions. *Environ Health Perspect* 114:307-312.
- Stein J, Schettler T, Wallinga D, Valenti M (2002) In harm's way: toxic threats to child development. *J Dev Behav Pediatr* 23:S13-22.
- Straliotto MR, Mancini G, de Oliveira J, Nazari EM, Muller YM, Dafre A, Ortiz S, Silva EL, Farina M, Latini A, Rocha JB, de Bem AF (2010) Acute exposure of rabbits to diphenyl diselenide: a toxicological evaluation. *J Appl Toxicol* 30:761-768.
- Tomimoto H, Yamamoto K, Homburger HA, Yanagihara T (1993) Immunoelectron microscopic investigation of creatine kinase BB-isoenzyme after cerebral ischemia in gerbils. *Acta Neuropathol* 86:447-455.
- Tsuchiya K (1969) Epidemic of mercury poisoning in the Agano River area--an introductory review. *Keio J Med* 18:213-227.
- Ullrich SMT, T.W.; Abdrashitova, S.A. (2001) Mercury in the aquatic environment: a review of factors affecting methylation. *Crit Rev Environ Sci Technol* 31:241-293.
- Vecchio D (2005) Qualidade de vida e avaliação física em intoxicados por mercúrio: estudo observacional transversal descritivo. In: Faculdade de Educação Física, vol. Mestrado Campinas/SP: Universidade Estadual de Campinas.

- Vendelin M, Lemba M, Saks VA (2004) Analysis of functional coupling: mitochondrial creatine kinase and adenine nucleotide translocase. *Biophys J* 87:696-713.
- Voet DV, J.G. (1995) *Biochemistry*. New York: John Wiley & sons, Inc.
- Vyssokikh MY, Brdiczka D (2003) The function of complexes between the outer mitochondrial membrane pore (VDAC) and the adenine nucleotide translocase in regulation of energy metabolism and apoptosis. *Acta Biochim Pol* 50:389-404.
- Wagner C, Sudati JH, Nogueira CW, Rocha JB (2010a) In vivo and in vitro inhibition of mice thioredoxin reductase by methylmercury. *Biometals* 23:1171-1177.
- Wagner C, Vargas AP, Roos DH, Morel AF, Farina M, Nogueira CW, Aschner M, Rocha JB (2010b) Comparative study of quercetin and its two glycoside derivatives quercitrin and rutin against methylmercury (MeHg)-induced ROS production in rat brain slices. *Arch Toxicol* 84:89-97.
- Wallace DC (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283:1482-1488.
- Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM (1992) Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem J* 281 (Pt 1):21-40.
- Wendt S, Dedeoglu A, Speer O, Wallimann T, Beal MF, Andreassen OA (2002) Reduced creatine kinase activity in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice. *Free Radic Biol Med* 32:920-926.
- WHO (1990) *Environmental Health Criteria for Methylmercury*. International Program on Chemical Safety. . Geneva: World Health Organization.
- WHO W (1976) *Environmental Health Criteria 1. Mercury*. International Program on Chemical Safety Geneva: World Health Organization.
- Wilson SR, Zucker, P. A., Huang, R. R. C., and Spector, A. (1989) Development of synthetic compounds with glutathione peroxidase activity. *J Am Chem Soc* 111:5936–5939.

- Wyss M, Smeitink J, Wevers RA, Wallimann T (1992) Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1102:119-166.
- Xu J, Shi C, Li Q, Wu J, Forster EL, Yew DT (2007) Mitochondrial dysfunction in platelets and hippocampi of senescence-accelerated mice. *J Bioenerg Biomembr* 39:195-202.
- Yamamoto I (1985) [Studies on the behavior of mercury and selenium in blood of mice injected with those elements]. *Hokkaido Igaku Zasshi* 60:227-240.
- Yang J, Kunito T, Tanabe S, Miyazaki N (2007) Mercury and its relation with selenium in the liver of Dall's porpoises (*Phocoenoides dalli*) off the Sanriku coast of Japan. *Environ Pollut* 148:669-673.
- Yang Y, Lu B (2009) Mitochondrial morphogenesis, distribution, and Parkinson disease: insights from PINK1. *J Neuropathol Exp Neurol* 68:953-963.
- Yin Z, Jiang H, Syversen T, Rocha JB, Farina M, Aschner M (2008) The methylmercury-L-cysteine conjugate is a substrate for the L-type large neutral amino acid transporter. *J Neurochem* 107:1083-1090.
- Yin Z, Milatovic D, Aschner JL, Syversen T, Rocha JB, Souza DO, Sidoryk M, Albrecht J, Aschner M (2007) Methylmercury induces oxidative injury, alterations in permeability and glutamine transport in cultured astrocytes. *Brain Res* 1131:1-10.
- Yoneda S, Suzuki KT (1997) Detoxification of mercury by selenium by binding of equimolar Hg-Se complex to a specific plasma protein. *Toxicol Appl Pharmacol* 143:274-280.
- Yoshino Y, Mozai T, Nakao K (1966) Biochemical changes in the brain in rats poisoned with an alkylmercury compound, with special reference to the inhibition of protein synthesis in brain cortex slices. *J Neurochem* 13:1223-1230.
- Yuan G, Kaneko M, Masuda H, Hon RB, Kobayashi A, Yamazaki N (1992) Decrease in heart mitochondrial creatine kinase activity due to oxygen free radicals. *Biochim Biophys Acta* 1140:78-84.
- Zasso FB, Goncalves CE, Jung EA, Araldi D, Zeni G, Rocha JB, Nogueira CW (2005) On the mechanisms involved in antinociception induced by diphenyl diselenide. *Environ Toxicol Pharmacol* 19:283-289.